

UNIVERSITE DE GENEVE

FACULTE DES SCIENCES

Département de biologie moléculaire

Prof. P. - F. SPAHR

Institut de microbiologie (Faculté de Médecine)

Prof. R. H. REGAMEY

BACTERIOPHAGES MALE-SPECIFIQUES A ARN.
CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DE $\mu 2$
ET ETUDE DE LA PROTEINE DE MATURATION DE R17

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences, mention biologique

par

Jean-Claude PIFFARETTI
de Arzo (Tessin)

Thèse No 1640

GENEVE

Imprimerie de la Section
de Physique

1 9 7 4



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545902_0017

UNIVERSITE DE GENEVE

FACULTE DES SCIENCES

Département de biologie moléculaire

Prof. P. - F. SPAHR

Institut de microbiologie (Faculté de Médecine)

Prof. R.H. REGAMEY

BACTERIOPHAGES MALE-SPECIFIQUES A ARN.
CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DE $\mu 2$
ET ETUDE DE LA PROTEINE DE MATURATION DE R17

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences, mention biologique

par

Jean-Claude PIFFARETTI

de Arzo (Tessin)

Thèse No 1640

GENEVE

Imprimerie de la Section
de Physique

1 9 7 4

La Faculté des sciences, sur le préavis du professeur R. H. REGAMEY,
directeur de thèse et d'une commission composée du professeur P. - F. SPAHR
(Faculté des sciences) et du docteur J. - S. PITTON (Faculté de médecine),
autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les
propositions qui y sont énoncées.

GENEVE, le 8 février 1974

Thèse 1640

Le Doyen :

Jean MULLER



Je remercie les professeurs R. - H. Regamey et P. - F. Spahr, le docteur J. - S. Pitton, privat-docent, le docteur C. Ahmad-Zadeh, privat-docent, Mlle Y. Froment, Mlle V. Hofer et Mme C. Follonier pour l'aide qu'ils m'ont apportée à la réalisation de ce travail.

J'exprime ma reconnaissance au docteur M. F. Paccaud (Section de virologie, Institut d'Hygiène) qui a préparé les stocks de virus de la polio, à Monsieur M. Maire pour sa collaboration lors des déterminations de la composition globale en acides aminés, ainsi qu'au professeur J. - P. Bargetzi (Laboratoire de biochimie, Université de Genève) dans les laboratoires duquel ces déterminations ont été faites.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

4

Buts de la présente étude

PREMIERE PARTIE

1. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DU BACTERIOPHAGE $\mu 2$

1.1	INTRODUCTION	10
1.2	MATERIEL ET METHODES	10
1.2.1	Matériel	10
1.2.2	Méthodes	11
1.2.2.1	Production du bactériophage $\mu 2$	11
1.2.2.2	Purification du bactériophage $\mu 2$	13
1.2.2.3	Détermination du titre des particules infectieuses	14
1.2.2.4	Production et purification du virus polio	14
1.2.2.5	Production et purification des ribosomes	15
1.2.2.6	Microscopie électronique	15
1.2.2.7	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide pour les protéines	15
1.2.2.8	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide pour l'ARN	16
1.2.2.9	Détermination du coefficient de sédimentation	16
1.2.2.10	Détermination de l'absorption spécifique du phage $\mu 2$	16
1.2.2.11	Détermination du PM des protéines par électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS	16
1.2.2.12	Détermination du PM des acides ribonucléiques par électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS	16
1.2.2.13	Dosage des protéines	17
1.2.2.14	Dosage de l'acide nucléique	17
1.2.2.15	Détermination de la densité du bactériophage $\mu 2$	17
1.2.2.16	Essais enzymatiques	18
1.2.2.17	Extraction de la protéine capsidique	18
1.2.2.18	Filtration sur gel de Séphadex de la protéine capsidique	18
1.2.2.19	Concentration de la protéine de maturation du bactériophage $\mu 2$	18
1.2.2.20	Production d'antisérum	19
1.2.2.21	Tests immunologiques	19
1.2.2.22	Sérum adsorbé	19
1.2.2.23	Propagation des phages fr et R17	19
1.2.2.24	Production de bactériophages marqués au C^{14}	19
1.2.2.25	Détermination de la radioactivité à l'intérieur des gels d'acrylamide-SDS	20
1.2.2.26	Détermination de la composition globale en acides aminés	20
1.2.2.27	Immunoélectrophorèse	21
1.2.2.28	Point isoélectrique de la protéine capsidique	21
1.3	RESULTATS	22
1.3.1	Critères de pureté	22
1.3.2	Critères d'identité	25
1.3.3	Absorption spécifique	25

1.3.4	Action de quelques enzymes sur l'infectiosité du bactériophage $\mu 2$	25
1.3.5	Coefficient de sédimentation du bactériophage $\mu 2$	26
1.3.6	Densité du bactériophage $\mu 2$	28
1.3.7	Poids moléculaire de la protéine capsidique du bactériophage $\mu 2$	28
1.3.8	Poids moléculaire de la protéine de maturation de $\mu 2$	30
1.3.9	Poids moléculaire de l'acide ribonucléique du bactériophage $\mu 2$	31
1.3.10	Pourcentage de l'ARN dans le bactériophage $\mu 2$	32
1.3.11	Poids particulaire (PP) du bactériophage $\mu 2$	32
1.3.12	Etude de la parenté immunologique entre le bactériophage $\mu 2$ et d'autres bactériophages mâle-spécifiques à ARN	33
1.3.13	Composition globale en acides aminés de la protéine capsidique du bactériophage $\mu 2$	35
1.3.14	Nombre de molécules de protéine de maturation par particule phagique de $\mu 2$	36
1.3.15	Immuno-électrophorèse	38
1.3.16	Point isoélectrique de la protéine capsidique	38
1.4	DISCUSSION	38
1.4.1	Parenté physico-chimique	40
1.4.2	Parenté immunologique	40
1.4.3	Protéine capsidique	40
1.5	CONCLUSION	41

DEUXIEME PARTIE

2.	<u>ETUDE SUR LA PROTEINE DE MATURATION DU BACTERIOPHAGE R17</u>	42
2.1	INTRODUCTION	43
2.2	MATERIEL ET METHODES	43
2.2.1	Méthodes	43
2.2.2	Electrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide en présence de SDS	44
2.2.3	Purification du chlorhydrate de guanidine (guanidium-HCl)	45
2.2.4	Purification partielle de la protéine de maturation selon Steitz	45
2.2.5	Purification de la protéine de maturation	45
2.2.6	Elimination du dodécylsulfate de sodium	46
2.2.7	Purification de l'ARN du phage R17	47
2.2.8	Contrôle de l'homogénéité de l'ARN du bactériophage R17	47
2.2.9	Reconstitution de particules infectieuses	47
2.2.10	Attachement de la protéine capsidique à l'ARN	47
2.2.11	Marquage de la protéine de maturation au SDS-S ³⁵	48
2.3	RESULTATS	48
2.3.1	Pureté du bactériophage R17	48
2.3.2	Pureté de la protéine de maturation	48
2.3.3	Elimination du dodécylsulfate de sodium de la protéine de maturation	50
2.3.4	Elimination du SDS-S ³⁵ de la protéine de maturation	50
2.3.5	Elimination de l'urée	52
2.3.6	Poids moléculaire de la protéine de maturation	52
2.3.7	Reconstitution du pouvoir infectieux du bactériophage R17	52
2.3.8	Reconstitution du pouvoir infectieux selon Roberts et Steitz	55

2.4 DISCUSSION	56
2.4.1 Modifications irréversibles de la protéine de maturation	56
2.4.2 Facteurs nécessaires à la reconstitution	56
2.5 CONCLUSION	57
BIBLIOGRAPHIE	58

INTRODUCTION

En 1960, Loeb isola à partir d'eaux d'égoûts un bactériophage capable d'infecter spécifiquement les bactéries *E. coli* K 12 F⁺ et Hfr, bactéries dites 'mâles' (69). Des recherches ultérieures sur les bactériophages mâle-spécifiques montrèrent qu'une partie de ceux-ci possédaient un génôme du type ARN (70) et que tous s'adsorbaient sur les fimbries sexuelles des cellules F⁺ et Hfr (14, 115).

Depuis, d'autres bactériophages mâle-spécifiques à ARN ont été découverts en Europe, aux Etats-Unis, au Japon, en Australie. Cependant, bien que d'origine géographique disparate, ces virus bactériens se caractérisent par une constitution physique semblable et une composition chimique le plus souvent très proche, ce qui soulève le problème intéressant de leur origine phylogénique. On peut, en effet, se demander comment des organismes qui se sont multipliés en des endroits si différents ont pu conserver de telles relations de parenté, que viennent encore confirmer des études immunologiques (96).

Ces bactériophages, qui se caractérisent donc par des traits communs de leur structure, sont constitués par une molécule d'ARN monocaténaire et par une enveloppe protéinique formée de deux types de protéines. L'une de ces protéines, dite protéine capsidique, est présente en 180 exemplaires par particule phagique; l'autre, dite protéine de maturation, n'existe probablement qu'en un seul exemplaire (77).

Au microscope électronique, la capside présente une forme globulaire; selon la théorie de l' 'arrangement quasi-équivalent' de Caspar et Klug (15), sa symétrie est vraisemblablement icosaédrique; une preuve convaincante de cet arrangement serait la polymérisation spontanée des sous-unités protéiques par formation d'enveloppes de type icosaédrique. Pour les bactériophages mâle-spécifiques à ARN, un tel type d'assemblage fut réalisé *in vitro* (43, 48, 110).

Les particules phagiques ont un diamètre d'environ 270 Å, un coefficient de sédimentation qui se situe autour de 78 S et un poids particulaire de $3,6 \times 10^6$ (102). Le contenu en ARN des particules phagiques est en moyenne de 30% (102).

L'acide ribonucléique possède un PM estimé à $1,0-1,1 \times 10^6$, un faible rayon de giration (160 Å en NaCl 0,2 M; 190 Å en NaCl 0,1 M) et un coefficient de sédimentation qui oscille autour de 27 S (32, 76, 109), toutes valeurs montrant que la molécule offre une structure compacte. Nous en trouvons confirmation dans les études de dénaturation thermique et de traitement par la formaldéhyde, études qui révèlent que l'ARN se caractérise par un taux élevé de liaisons hydrogènes et de 'base-stacking' (12, 76, 109).

Des progrès considérables ont été réalisés dans la détermination de la séquence des nucléotides de l'ARN. Chez certains bactériophages, les régions de l'ARN qui se lient aux ribosomes pendant l'initiation de la synthèse des protéines ont été isolées et leur séquence identifiée (74, 100, 107, 108). D'autres régions de l'ARN sont aussi connues : l'extrémité 5' (2, 4, 8), le cistron de la protéine capsidique (3, 49, 74, 83), certaines régions intercistroniques (7, 21, 82) ainsi que l'extrémité 3' (20). Ces molécules d'ARN, dont la séquence est en partie déchiffrée, jouent actuellement un rôle important dans l'étude de la synthèse des protéines, surtout au niveau de l'initiation.

Du point de vue génétique, des expériences de complémentation à l'aide de mutants 'amber' ou thermosensibles ont permis d'identifier trois cistrons sur le génôme des bactériophages mâle-spécifiques à ARN. Les mutations dans ces trois cistrons provoquent en effet des variations caractéristiques en rapport avec la production de particules infectieuses.

Certains mutants du premier groupe cistronique ne produisent ni particules virales, ni ARN. Leur gène correspond à celui de l'ARN-synthétase (38, 46).

D'autres mutants du deuxième groupe cistronique élaborent des particules défectives incapables de s'adsorber sur les fimbries sexuelles; de plus, ils sont sensibles à l'action enzymatique de la ribonucléase (les particules infectieuses normales sont insensibles à cette action); leur gène correspond à celui de la protéine de maturation (6, 42, 66). Enfin, d'autres mutants du troisième groupe cistronique ne sont à l'origine d'aucune particule infectieuse. La teneur en ARN phagique ou en ARN-synthétase de la cellule hôte reste cependant normale ou même supérieure à la normale. Ces mutants inhibent la croissance de la cellule-hôte sans toutefois parvenir à la lyser; leur gène correspond à celui de la protéine capsidique ou 'coat protein' (45, 65).

L'analyse génétique par recombinaison n'a pas eu de succès chez les bactériophages à ARN. Aussi a-t-il fallu se baser sur d'autres techniques pour que la séquence des gènes dans la molécule d'ARN puisse être déterminée.

Pour le phage R17, la détermination de la séquence d'un fragment ribonucléique comprenant l'extrémité 3' du cistron de la protéine capsidique a montré que ce cistron était proche de celui de la synthétase (82). La fragmentation spécifique du génôme de ce même phage suivie de l'utilisation des fragments pour des expériences de synthèse peptidique 'in vitro' (33, 99), de liaison aux ribosomes et de détermination de séquence (50) a suggéré l'existence de l'ordre des gènes suivants :

5'-----Mat.-----Coat-----Synth.-----3'

Cette succession a été confirmée pour le phage M12 par l'identification des produits de la traduction 'in vitro' de fragments ribonucléiques provenant de la réplication progressive du génôme (56), et pour le phage Q β par des expériences de marquage progressif de l'ARN au P³² (41) ainsi que par des expériences de détermination de séquence (101).

Ces trois gènes sont séparés les uns des autres par des régions intercistroniques qui ne sont probablement pas traduites (7, 21, 82).

Quelques connaissances sur la physiologie de l'infection doivent être rappelées. Les bactériophages à ARN injectent leur génôme à l'intérieur de la cellule bactérienne (89) après s'être adsorbés sur les fimbries sexuelles (14, 115). La protéine de maturation semble aussi pénétrer à l'intérieur de la bactérie en même temps que l'ARN (57, 58). La molécule d'ARN injectée (brin +) dirige ensuite la production de la synthétase en utilisant l'appareil de synthèse des protéines de l'hôte. Sous l'influence de cette enzyme il se forme, à partir des brins +, des complexes brin+/brin- (formes répliquatives) (29, 31, 35). Les formes répliquatives vont permettre à la synthétase de produire, selon un mode répétitif ('replicative intermediate'), de nouveaux brins +, c'est-à-dire de nouveaux génômes viraux (29, 36). Ces derniers brins vont à leur tour servir de

messagers pour la synthèse de la protéine capsidique et de la protéine de maturation. Ensuite, les divers constituants phagiques s'assemblent; chaque cellule bactérienne libère finalement de 1000 à 40.000 particules infectieuses (102).

Le rôle de la bactérie hôte ne se limite pas seulement à fournir les nucléosides triphosphates et les éléments nécessaires à la synthèse des protéines. Il semble que les ribosomes bactériens puissent exercer un contrôle sur l'initiation de la synthèse peptidique; en effet, dans un système de synthèse de protéines 'in vitro', dirigé par de l'ARN phagique, les ribosomes de B. stearothermophilus traduisent spécifiquement et à un taux élevé le cistron de la protéine de maturation, ce qui n'est pas le cas pour les ribosomes de E. coli (64, 67). Quant à la cellule bactérienne, elle semble jouer aussi un rôle important sur l'activité de la synthétase cistronique; chez le phage Q β , cette enzyme doit être associée à différents facteurs cellulaires, soit au facteur d'interférence i (37, 51) ainsi qu'aux facteurs d'élongation Tu et Ts (10). La cellule hôte intervient encore très probablement lors de l'assemblage des particules infectieuses (91) ou lors de leur relâchement hors de la cellule (24, 25).

Il est possible de suivre la synthèse des trois protéines phagiques tout au long du cycle infectieux. Dans un système comprenant des acides aminés radioactifs et un antibiotique inhibant la synthèse de l'ARN cellulaire, pratiquement seules les protéines phagiques sont synthétisées. On peut alors les séparer au moyen de gels d'acrylamide et révéler leur présence. On observe alors que les trois cistrons phagiques ne sont traduits ni simultanément, ni à des taux constants (85, 118). Au début de l'infection, la traduction de la synthétase est relativement importante, puis sa production se ralentit pour même disparaître après 30 min environ. La protéine de maturation et surtout la protéine capsidique apparaissent plus tardivement : la synthèse de la première atteint assez rapidement un plateau, celle de la seconde continue à un taux élevé pendant pratiquement tout le cycle infectieux.

Ces études, associées à des expériences 'in vivo' et 'in vitro' sur des mutants phagiques, ont permis de comprendre, en partie du moins, le mécanisme de régulation impliqué dans la traduction des gènes phagiques.

- La production de la synthétase est liée à la traduction de la partie initiale du cistron de la protéine capsidique. Une mutation 'amber' en position 6 de ce cistron empêche la traduction de la synthétase (17). En effet, dans un système de synthèse de protéines 'in vitro', les ribosomes se lient d'abord au site d'initiation de la protéine capsidique (62, 63, 107); la progression du ribosome au début du cistron 'coat' a probablement pour effet de modifier la structure tridimensionnelle de l'ARN et de permettre ainsi l'accès des ribosomes au site d'initiation du cistron synthétase (68).
- L'inhibition de la production de la synthétase est due à la présence d'un certain taux de protéine capsidique, ce qu'ont démontré des essais 'in vivo' (80, 117) et 'in vitro' (63, 111). Des expériences de liaison ARN-protéine capsidique (98) ainsi que de détermination de séquence (7) ont établi que quelques molécules de 'coat protein' peuvent se lier spécifiquement à l'ARN, plus précisément à la région qui correspond en partie au site d'initiation de la synthétase.
- Au début du cycle infectieux, l'inhibition de la traduction de la protéine

- capsidique paraît due à la synthétase; des expériences 'in vitro' avec Q β montrent que cette enzyme réprime la synthèse de la protéine capsidique en se fixant dans la région du site d'initiation de cette protéine (52, 53).
- La traduction de la protéine de maturation serait contrôlée; ainsi, la translation ne serait possible que sur une chaîne naissante d'ARN; c'est ce que suggèrent des expériences 'in vitro' faites avec l'ARN de Q β (52, 53, 67).

Buts de la présente étude

La première partie de cette étude est consacrée à la caractérisation physico-chimique du bactériophage mâle-spécifique à ARN μ 2 (22). Ce bactériophage est utilisé dans notre Institut pour différencier certaines souches bactériennes de E. coli porteuses de plasmides sexuels. Il nous a paru intéressant de compléter l'étude physico-chimique déjà réalisée (18) et de déterminer la parenté de ce virus avec les autres bactériophages du même type.

La deuxième partie de nos recherches est consacrée à la protéine de maturation du bactériophage R17. Cette protéine se caractérise par son insolubilité dans les milieux aqueux usuels, ce qui rend son étude particulièrement difficile. Nous avons tenté d'étudier les fonctions physiologiques de cette protéine à partir d'une préparation purifiée.

PREMIERE PARTIE

1. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DU BACTERIOPHAGE $\mu 2$

1.1 INTRODUCTION

Le bactériophage $\mu 2$ a été isolé à partir d'échantillons des égouts de Milan lors d'une recherche systématique de bactériophages sexuel-spécifiques (22). Les échantillons prélevés étaient traités au chloroforme et étalés sur des plaques de gélose contenant, comme souche bactérienne indicatrice, une suspension de E. coli F^+ ou F^- . Le caractère sexuel-spécifique de la particule virale analysée était évalué en fonction de la lyse obtenue par rapport à la bactérie hôte.

Les auteurs italiens qui ont isolé le bactériophage $\mu 2$ ont montré que, après l'infection d'une culture de E. coli F^+ , il subsistait toujours une fraction importante de bactéries survivantes et que la lyse par $\mu 2$ de la culture bactérienne de propagation n'était pas possible en milieu liquide (23). Une brève étude physico-chimique fut aussi réalisée par la même équipe de chercheurs, qui détermina la densité ainsi que le coefficient de sédimentation du bactériophage $\mu 2$. Il fut en outre vérifié que le génôme de la particule infectieuse était constitué par de l'ARN dont la composition relative en bases fut déterminée (18). Ces études ont été faites à partir de préparations phagiques brutes, qui n'avaient pas été purifiées par centrifugation sur gradient. Il nous a paru intéressant de pousser plus loin l'étude physico-chimique du bactériophage $\mu 2$, d'autant plus que nous pouvions disposer facilement de préparations plus pures que celles de Dettori et al. Le but recherché était d'établir si cette particule virale était aussi proche d'autres déjà décrites dans la littérature, telles que R17, fr, f2, ...

Nous avons tout d'abord vérifié s'il était exact qu'après infection par $\mu 2$ une lyse cellulaire n'était pas réalisable en milieu liquide.

Nous avons ensuite étudié la sensibilité des particules infectieuses à l'action d'enzymes telles que la ribonucléase, la désoxyribonucléase et la trypsine.

Après avoir contrôlé quelques caractères déjà connus, nous avons aussi déterminé d'autres paramètres tels que PM des constituants, PM de la particule infectieuse, composition en acides aminés de la protéine capsidique. Nous avons enfin établi quelques relations de parenté immunologique avec d'autres bactériophages mâle-spécifiques à ARN.

1.2 MATERIEL ET METHODES

1.2.1. Matériel

a) Produits

Les produits usuels proviennent soit de Merck A.G., Darmstadt (Allemagne), soit de Calbiochem (Lucerne).

Le Séphadex fut obtenu de Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala).

L'acrylamide et le bis-acrylamide ont été livrés par Eastman Kodak (Rochester, New York).

Le Temed (N,N,N',N',-tétraméthyléthylènediamine) provient de Canalcro (Bethesda).

Les produits radioactifs ont été commandés à 'The Radiochemical Center' (Amersham).

b) Bacteries et Phages

<u>E. coli</u>	K12-701	wild-type F ⁺
	K12-703	wild-type F ⁻
	K12-501	met ⁻ azi ^S str ^S T1 ^S T6 ^S <u>F⁺</u>
	K12-Hfr Hayes	str ^S λ ⁻
	D10	met ⁻ RNAse I ⁻ (λ) Hfr
	K12-795 Hfr Broda	met ⁻ str ^S

Phages R17 sauvage (P. F. Spahr)
 μ 2 sauvage (J. S. Pitton)
fr sauvage (W. Arber)
Q β sauvage (P. F. Spahr)

Virus Polio virus type I, LSC 20b (souche vaccinale de Sabin).

c) Appareils courants

Ultracentrifugeuse Beckman-Spinco L2 65B
Ultracentrifugeuse Beckman-Spinco L50
Centrifugeuse MSE High Speed 18
Spectrophotomètres Beckman DB et DB GT
Compteur de radioactivité Beckman LS-100

Liquides scintillants :

- Kinard
- Cocktail D de Beckman acceptant jusqu'à 25% d'eau :

2, 5-diphényloxazol (=PPO)	5 g
Naphtalène	100 g
Dioxane	ad 1 litre

Appareil pour électrophorèse sur gel d'acrylamide Büchler.

d) Abréviations

SDS : dodécylsulfate de sodium
p. i. : particules infectieuses
TPM : tours par minute
CPM : coups par minute
DO₂₆₀ : densité optique à une longueur d'onde de 260 nm
PM : poids moléculaire
PP : poids particulaire

1.2.2 Méthodes

1.2.2.1. Production du bactériophage μ 2a) Production à partir d'un milieu semi-solide

10 ml de gélose molle (Bactotryptone Difco 1%; NaCl 0,5%; Bacto-agar Difco 0,3%; CaCl₂ 2mM; pH=7) sontensemencés à 45°C avec 0,3 ml d'une culture de 3 h en bouillon ordinaire (Bacto nutrient broth Difco, 20 g/l) de E. coli K12-795. La suspension est infectée avec suffisamment de phages pour l'obtention d'une multiplicité d'infection de 10. La gélose fondue est coulée sur des plaques de 50 ml de gélose ordinaire (Bacto tryptone Difco 1%; NaCl

0,5%; Bacto-agar Difco 1,5%; pH=7) et incubée pendant 8 heures à 37°C. Après incubation, les plaques montrent une lyse confluyente. La culture obtenue sur gélose molle est raclée à l'aide de spatules de verre, suspendue dans 10 ml de bouillon ordinaire et triturée pendant 5 min dans un mixer Polytron (Kinematica GMBH, Lucerne) à 15.000 TPM. Au broyat sont ajoutées 4 gouttes de toluène destiné à compléter la lyse des cellules. La suspension est alors incubée 1 h à 39°C avec une agitation vigoureuse toutes les 10 min. Le lysat est centrifugé 10 min à 5000 $\underline{g}$ (séparation du toluène de la phase aqueuse), puis placé dans un dessiccateur contenant de la gaze imprégnée de vaseline. Le dessiccateur est placé sous vide à 38°C pendant 90 min dans le but d'absorber les vapeurs de toluène sur la vaseline. La suspension est maintenant centrifugée 20 min à 12.000 $\underline{g}$ (sédimentation des débris bactériens) et le surnageant est conservé à 4°C, prêt pour la suite de la purification.

Le lysat possède un titre d'environ 10^{12} p.i./ml.

b) Production à partir d'un milieu liquide

La production du phage $\mu 2$ en milieu semi-solide demande passablement de temps et de travail, aussi avons-nous essayé de propager $\mu 2$ en milieu liquide. Dans des conditions semblables à celles utilisées pour la propagation en milieu semi-solide (même milieu mais sans gélose; agitation de la culture ou aération), on n'obtient pas de lyse visible après l'infection; le titre en particules infectieuses reste assez faible : environ 10^{10} p.i./ml.

Nous avons alors essayé de faire varier quelques paramètres : pH, force ionique, concentration en Ca^{++} , adjonction de sources énergétiques supplémentaires telles que glucose, glycérol, recours à d'autres souches bactériennes de propagation, sans pour autant obtenir de meilleurs résultats.

Finalement, une lyse de la culture bactérienne infectée ainsi qu'un bon titre ont pu être obtenus à l'aide d'une aération violente avec comme souche de propagation bactérienne, E. coli D10.

La méthode choisie pour la culture en milieu liquide a été la suivante : 200 ml d'une culture de 15 h de E. coli D10 sont inoculés dans 5 l de bouillon contenant :

NaCl	5 g/l
NH ₄ Cl	1 g/l
Tris 1M, pH 7,4	10 ml/l
Glycérol	4 ml/l
Bacto vitamin-free casamino acids (Difco)	5 g/l
MgCl ₂	1 mM
KH ₂ PO ₄	0,3 mM
FeCl ₃	0,01 mM
CaCl ₂	2 mM
NH ₄ OH conc.	ad pH 7,4

La culture est incubée à 38°C sous une forte aération et la croissance est

suivie par la détermination de la DO_{545} .

Lorsque la DO atteint 0,750 (correspondant à un titre bactérien de $10^8/\text{ml}$), on arrête l'aération pendant 20 min pour laisser se reformer les fimbries sexuelles dans les meilleures conditions possibles. Une forte aération entraîne en effet une forte agitation, qui pourrait rompre les organelles et empêcher ainsi l'adsorption des phages. Après ce temps de repos, la culture est infectée avec une suspension de $\mu 2$ devant assurer une multiplicité d'infection de 5 à 20. On laisse encore la culture 5 min au repos pour permettre l'adsorption, ensuite l'aération est reprise. La lyse de la culture survient en général 3 à 4 h après l'infection. La Figure 1 montre la cinétique de la croissance bactérienne obtenue dans de telles conditions. Environ 10 h après le début de l'essai, soit 3 h après le début de la lyse, on introduit 10 mg/l de lysozyme, et on incube encore 20 min. Le lysozyme et le chloroforme favorisent la lyse des cellules bactériennes restantes. A ce stade, le titre moyen du lysat est d'environ 10^{12} p.i./ml.

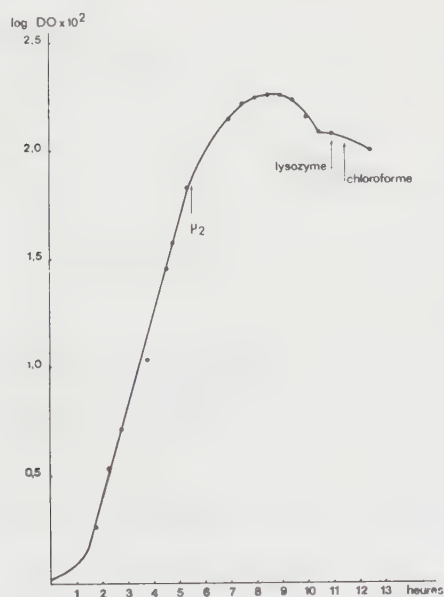


Fig.1. Cinétique de la croissance bactérienne d'une culture de *E. coli* D10 infectée par le phage $\mu 2$. Multiplicité d'infection : environ 10.

1.2.2.2. Purification du bactériophage $\mu 2$

Le lysat obtenu sous 1.2.2.1 est traité selon la méthode de Enger et al. (27) avec les modifications suivantes :

- Le tampon de resuspension utilisé est du SSC (NaCl 0,15 M; citrate de Na 0,015 M, pH 7);
- La suspension finale est purifiée par un gradient de CsCl (densité moyenne initiale : 1,44); après centrifugation, la bande contenant les phages est recueillie, diluée dix fois avec du tampon SSC et centrifugée 3 h à 100.000 g. Le culot final est suspendu dans du tampon SSC.

La Figure 2 présente les résultats obtenus par détermination de la DO_{260} ainsi que le titre en p.i./ml des fractions récoltées du gradient.

Pour disposer d'une préparation encore plus pure, on passe la préparation de bactériophages sur un deuxième gradient préformé et discontinu de CsCl, suivant une adaptation de la technique de Yamamoto et al.(124). La Figure 3 représente la composition du gradient utilisé.

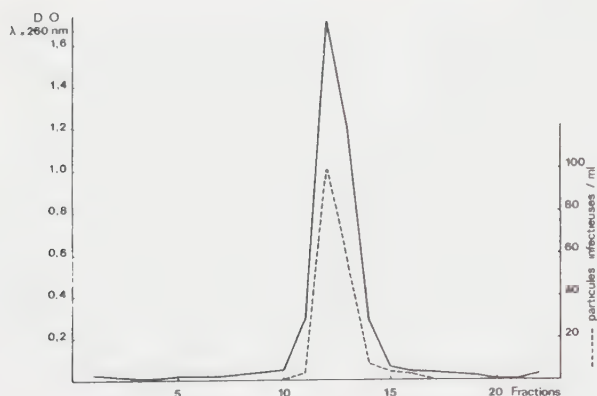


Fig. 2. Centrifugation en gradient de CsCl d'un lysat concentré de phage $\mu 2$.

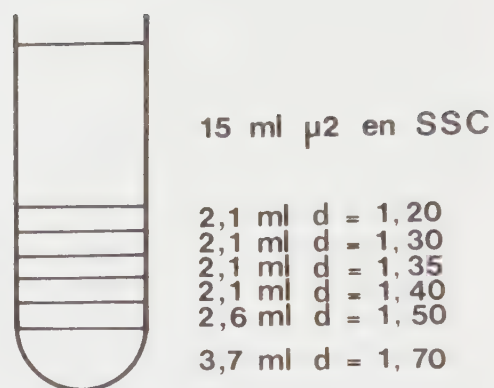


Fig. 3. Schéma du gradient préformé de CsCl.

On détermine les densités en mesurant l'indice de réfraction des mélanges SSC-CsCl à l'aide d'un réfractomètre Zeiss. Le gradient est centrifugé 22 h à 60.000 g à 4°C (Rotor Spinco SW25.1).

1.2.2.3. Détermination du titre des particules infectieuses

Deux méthodes de titrage ont été utilisées :

- le titrage par 'spot-test', rapide mais peu précis, et
- le titrage de précision, décrit par Adams (1).

a) Titrage par 'spot-test'

Sur une plaque de gélose ordinaire, on étale à l'anse une goutte d'une culture indicatrice de *E. coli* D10 en différents endroits de la surface. On laisse sécher et on dépose ensuite 10 μ l d'une dilution déterminée de la suspension phagique à titrer. La lecture peut se faire déjà après 3 h d'incubation à 38°C. On déduit le titre approximatif de la suspension à partir du nombre de plages formées.

b) Titrage de précision

La composition des milieux utilisés est la même que celle décrite pour la propagation de $\mu 2$ (cf 1.2.2.1). 2,5 ml d'agar mou porté à 45°C sont inoculés avec 0,1 ml d'une culture indicatrice de *E. coli* D10 (culture de 3 h concentrée 3 fois), puis infectés avec 0,1 ml d'une dilution déterminée de suspension phagique. Le mélange est coulé sur une plaque de gélose, qu'on incube à 38°C pendant 15 à 18 h. Du nombre de plages qui apparaissent et compte tenu de la dilution utilisée, on déduit le titre en p.i./ml de la suspension phagique initiale.

1.2.2.4. Production et purification du virus polio

Le stock de virus a été produit sur une lignée Vero (cellules de rein de singe vert africain : *Cercopithecus aethiops sabens*) selon Rhim et al. (93). Nous avons préparé au total 7,5 litres de culture, qui titrait 10^7 p.i./ml. Les virus sont concentrés à l'acétate de Zn (81), puis purifiés par partition liquide avec du 'Génétron 113' (trichloro-1,1,2, - trifluoro éthane, Fluka) selon la technique décrite par Hamparian et al. (40). Ils sont ensuite soumis à deux

cycles de centrifugations à basse et haute vitesse. La suspension finale est centrifugée sur un gradient de CsCl (densité initiale moyenne : 1,33) et les fractions récoltées sont analysées en fonction de la DO_{260} et du titre en p.i.. La Figure 4 exprime les résultats obtenus. Les fractions contenant du virus sont dialysées extensivement contre de l'eau distillée à 4°C et contrôlées au microscope électronique.

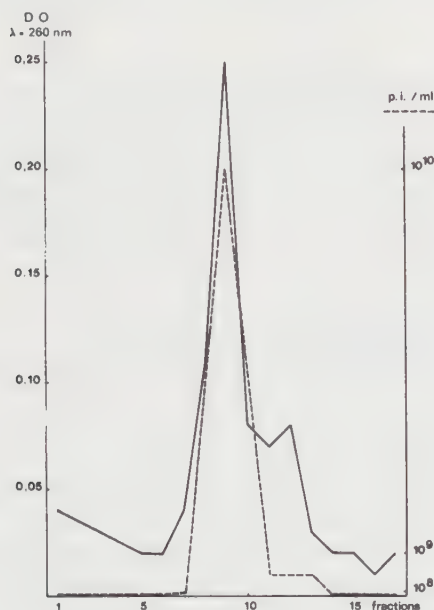


Fig.4. Centrifugation en gradient de CsCl du virus de la polio. Le pic mineur obtenu par la détermination de la DO_{260} correspond aux capsides vides (microscopie électronique).

1.2.2.5. Production et purification des ribosomes

Les ribosomes de *E. coli* MRE 600 sont préparés et purifiés selon la méthode décrite par Tissières et al. (114).

1.2.2.6. Microscopie électronique

Une goutte de la suspension à examiner est déposée pendant 1 min sur une grille porte-objet supportant un film de parlodion et de carbone. La préparation est ensuite lavée avec du tampon phosphate 0,01 M, pH 7 et colorée 20 secondes au phosphotungstate de Na 2%, pH 7 (coloration négative). Le microscope utilisé est un JEM T7 (Centre de Microscopie Electronique de l'Université de Genève).

1.2.2.7. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide pour les protéines

Les gels de polyacrylamide (10 et 15%) contenant du dodécylsulfate de sodium (SDS) ont été préparés selon les méthodes de Weber et Osborn (122) et de Ahmad-Zadeh et al. (5). L'électrophorèse dure 4 h pour les gels de polyacrylamide à 10% et 6 h pour les gels à 15%; le courant, constant, est de 8 mA par gel. Les gels sont ensuite colorés 2 h par du bleu de coomasie (2,5 g de colorant, 454 ml de méthanol, 92 ml d'acide acétique, H_2O ad 1 litre), puis décolorés dans une solution de décolorant (75 ml d'acide acétique, 50 ml de méthanol, H_2O ad 1 litre) par électrophorèse au moyen d'un courant électrique perpendiculaire à l'axe longitudinal des gels.

1.2.2.8. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide pour l'ARN

Les gels de polyacrylamide (2,6%) contenant du dodécylsulfate de sodium sont préparés selon la méthode de Bishop et al. (9). L'électrophorèse dure 4 h sous un courant constant de 5 mA/gel. Le gel est ensuite introduit dans une cuve de quartz, placée sur le support mobile d'un spectrophotomètre Gilford. La présence de bandes d'ARN est déterminée par la mesure de la DO₂₆₀ le long du gel.

1.2.2.9. Détermination du coefficient de sédimentation

La mesure du coefficient de sédimentation est réalisée sur une ultra-centrifugeuse analytique Spinco, Modèle E (Beckmann), à l'aide d'un rotor AN-D. La technique utilisée a été décrite par Svedberg et Pederson (113) et Pickels (92). Pendant la centrifugation, on suit la sédimentation des particules analysées grâce à un système optique Schlieren incorporé à l'appareil.

1.2.2.10. Détermination de l'absorption spécifique du phage $\mu 2$

Nous évaluons l'absorption spécifique en pesant la masse des phages dans une suspension dont la DO₂₆₀ est connue.

1.2.2.11. Détermination du PM des protéines par électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS

Le principe de la méthode est basé sur la relation linéaire qui existe entre les logarithmes des PM des chaînes polypeptidiques et leur vitesse de migration, pendant une électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS (97,122).

Un mélange contenant 1⁰, des protéines de référence dont les PM sont connus, 2⁰, la protéine 'inconnue', ainsi que 3⁰, du bromophénol bleu, est appliqué sur une série de gels et soumis à une électrophorèse. La période de migration terminée, les gels sont colorés et décolorés; les distances de migration sont mesurées, ainsi que les longueurs des gels avant et après la coloration-décoloration. On détermine ensuite les mobilités de chaque protéine suivant la relation proposée par Weber et Osborn (122).

$$\text{Mobilité} = \frac{\text{distance de migration de la protéine}}{\text{longueur du gel après décoloration}} \times \frac{\text{longueur du gel avant coloration}}{\text{distance de migration du colorant}}$$

La relation existant entre les mobilités et les logarithmes des PM permet d'établir la droite étalon pour les protéines de référence et de déterminer ensuite le PM de la protéine 'inconnue' à partir de sa mobilité.

Pour les déterminations que nous avons faites, les données ont été traitées par l'ordinateur CDC 3800 de l'Université de Genève (5).

1.2.2.12. Détermination du PM des acides ribonucléiques par électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS

Le principe de la méthode appliquée pour l'estimation du PM d'un acide ribonucléique est le même que pour les chaînes polypeptidiques. Les modifications expérimentales sont les suivantes :

- a) La longueur des gels est mesurée uniquement sur l'électrophorégramme, car les gels ne subissent ni coloration ni décoloration;
- b) la distance de migration des ARN est déterminée directement sur l'elec-

trophorégramme fourni par le spectrophotomètre Gilford.

c) La mobilité est estimée suivant la formule :

$$\text{Mobilité} = \frac{\text{distance de migration de l'ARN} \times 10}{\text{longueur du gel}}$$

d) La courbe étalon ainsi que la détermination du PM de l'ARN 'inconnu' sont faites graphiquement.

1.2.2.13. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est réalisé par absorption en UV, par la méthode du biuret décrite dans *Methods in Enzymology* III (pp.450-451) et par la méthode de Lowry (71). La courbe étalon est établie à l'aide de concentrations différentes d'albumine sérique de boeuf (Calbiochem).

1.2.2.14. Dosage de l'acide nucléique

Pour évaluer l'ARN, on dose le phosphate et le ribose.

a) Dosage du phosphate

La méthode utilisée (28) est décrite dans *Methods in Enzymology*, vol.III (pp.843-844). Les volumes des réactifs et des échantillons d'analyse sont réduits au vingtième, de façon à pouvoir disposer d'une micro-méthode. Les valeurs obtenues sont interprétées à l'aide d'une courbe étalon établie à partir de dilutions différentes d'une solution standard de KH_2PO_4 0,01 M. La courbe étalon est en outre contrôlée à l'aide d'un échantillon contenant une quantité connue de t-RNA. Cette réaction est délicate car la sensibilité de la micro-méthode se situe au niveau de 0,01 micro-mole de phosphate. La verrerie utilisée doit être absolument propre et ne porter en particulier aucune trace de détergents (qui contiennent des phosphates). La relation qui permet d'estimer la quantité d'acide ribonucléique à partir de la teneur en phosphate se base sur l'existence d'un radical phosphate par nucléotide :

0,01 μmole phosphate correspond à 3,40 μg ARN

b) Dosage du ribose par l'orcinol

La méthode utilisée (73) est décrite dans *Methods in Enzymology*, vol.III (p.681). Les valeurs obtenues sont interprétées à l'aide d'une courbe étalon établie à partir de dilutions différentes d'une solution standard de ribose 1 mM. La relation quantitative entre le ribose et l'ARN est la suivante :

0,01 μmole ribose correspond à 3,40 μg ARN

La sensibilité de la méthode atteint 0,01 μmole de ribose.

1.2.2.15. Détermination de la densité du bactériophage $\mu 2$

Cette densité est déterminée par ultracentrifugation dans un gradient de CsCl. 2,73 g de CsCl sont dissous dans 4,27 ml d'une suspension phagique; le mélange est ultracentrifugé pendant 40 h à 100,000 g, à 4°C (rotor Beckman-Spinco SW 39). Le fond du tube (en nitrate de cellulose) est percé, puis les fractions sont récoltées. L'indice de réfraction, la DO_{260} ainsi que le titre en particules infectieuses de chaque fraction sont ensuite déterminés. A

partir de ces données, on établit à quelle densité de CsCl, les particules infectieuses se stabilisent.

1.2.2.16. Essais enzymatiques

Les enzymes utilisés, DNase, RNase et trypsine, proviennent du pancréas de boeuf. 200 μ l de suspension phagique en bouillon ordinaire sont incubés pendant 1 h à 37°C en présence d'enzymes à la concentration de 3,5 μ g/ml. Le titre en particules infectieuses est déterminé, puis comparé au titre d'une suspension phagique témoin non traitée.

1.2.2.17. Extraction de la protéine capsidique

La protéine capsidique du bactériophage μ 2 est préparée par extraction à l'acide acétique selon la méthode de Sugiyama et al. (110). Pour disposer d'une préparation plus pure, on filtre sur gel de Séphadex.

1.2.2.18. Filtration sur gel de Séphadex de la protéine capsidique

Le Séphadex G75 (séparant les protéines dont le PM est compris entre 3000 et 70.000) est traité 48 h par l'acide acétique 0,001 M à température ambiante. La suspension, introduite dans une colonne K 25/30 (Pharmacia), de 2,5 cm de diamètre et de 30 cm de longueur, est lavée, puis équilibrée pendant 12 h avec de l'acide acétique 0,001 M (débit : 20,5 ml/h). Après application de l'échantillon, la colonne est éluée avec de l'acide acétique 0,001 M (débit : 20,5 ml/h). La Figure 5 représente l'élution de la colonne.

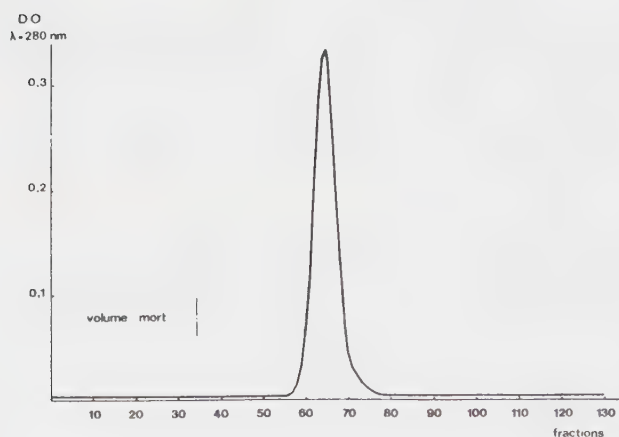


Fig.5. Filtration sur gel de Séphadex G75 de la protéine capsidique du phage μ 2. Le volume mort a été déterminé par du Bleu de Dextran.

1.2.2.19. Concentration de la protéine de maturation du bactériophage μ 2

La concentration de la protéine de maturation du bactériophage μ 2 est exécutée selon la méthode de Osborn et al. (86). On enlève partiellement la protéine capsidique du phage par extraction à l'acide acétique, puis on sépare l'ARN par une précipitation de protéines au SDS- K^+ à froid.

- Quelques modifications sont apportées à la technique d'Osborn et al. (86) :
- après le traitement à l'acide acétique, le culot contenant la protéine de maturation n'est pas lavé à l'éthanol 95%;

- ce culot est dissous dans une solution de SDS 1%, tampon phosphate 0,01 M, pH 7;
- après traitement au KCl, le culot protéinique est repris dans de l'eau distillée et dialysé contre du SDS 0,1%, tampon phosphate 0,01 M, pH 7, 2-mercaptoéthanol 0,1%.

1.2.2.20. Production d'antisérum

1 ml de suspension phagique contenant 500 μ g de phages est mélangé à 1 ml d'adjuvant de Freund complet (Difco, Bacto adjuvant). La suspension est injectée par voie intramusculaire dans la cuisse d'un lapin. Après 15 et 21 jours, on procède à deux autres injections à partir d'une suspension contenant 1 ml de phage (300 μ g) mélangé à 1 ml d'adjuvant de Freund incomplet. Quatre semaines après la première injection, on prélève le sang du lapin par ponction cardiaque. Pour permettre la coagulation, le sang est laissé 4 h à température ambiante, puis 12 h à 4°C. Le sérum, récolté par centrifugation, est conservé à -30°C.

1.2.2.21. Tests immunologiques

- a) Immunodiffusion : la technique utilisée est celle d'Ouchterlony (87);
- b) Neutralisation de l'infectiosité : la constante K exprimant l'activité de l'antisérum est déterminée selon la technique décrite par Clowes et Hayes (19).

1.2.2.22. Sérum adsorbé

Vu le contact permanent des lapins avec E. coli, il est fréquent de retrouver dans leur sang des anticorps contre cette bactérie. Les suspensions ou extraits de bactériophages peuvent renfermer des traces d'antigène de E. coli, non détectables par les méthodes analytiques usuelles, traces qui vont, lors de l'immunisation, réactiver la production d'anticorps anti-E. coli. Il en résulte que le sérum du lapin pourra présenter des réactions non-spécifiques face à la suspension d'antigène phagique. Pour éviter cette cause d'erreurs, on adsorbe l'antisérum avec un extrait brut de E. coli : 20 g de E. coli congelés sont broyés en présence d'alumine et suspendus dans 25 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 7. On centrifuge la suspension 20 min à 12.000 g et on additionne le surnageant d'un volume égal d'antisérum. Après une incubation de 48 h à 4°C, les complexes antigène-anticorps précipitables sont éliminés par une centrifugation de 30 min à 12.000 g.

1.2.2.23. Propagation des phages fr et R17

La propagation des phages fr et R17 est réalisée en milieu liquide selon la méthode décrite pour le bactériophage μ 2.

1.2.2.24. Production de bactériophages marqués au C¹⁴

50 ml d'une culture de 15 h de E. coli D10 sont inoculés dans 1,5 litre du milieu synthétique décrit par Steitz (104). La culture est incubée à 38°C sous forte agitation. Lorsque la DO₅₄₅ atteint 0,750, on ajoute le phage μ 2 (m.o.i. = 10) et 50 μ Ci d'un hydrolysate de protéines de chlorelles marquées au C¹⁴. Suite des opérations : cf 1.2.2.1b.

1.2.2.25. Détermination de la radioactivité à l'intérieur des gels d'acrylamide-SDS

A la fin de l'électrophorèse, les gels sont découpés, à l'aide d'une trame de fils d'acier, en tranches de 1,2 mm. Chaque tranche est digérée séparément par adjonction de 300 μ l d'une solution de NCS (NCS solubiliser, Amersham : 5 volumes; H₂O : 1 volume) à 40°C pendant 36 h; à la fin de la digestion, on ajoute 3 ml de liquide scintillant (cocktail D : cf 1.2.1.c).

1.2.2.26. Détermination de la composition globale en acides aminés

La détermination de la composition globale en acides aminés de la protéine capsidique du bactériophage μ 2 a été faite sur un Amino Acid Analyser (Beckman Spinco, Modèle 120 C). Le principe de la méthode (39) consiste à hydrolyser une solution protéinique, à en séparer les acides aminés par chromatographie sur colonne et à déterminer la quantité relative de chaque acide aminé par une lecture photométrique de la réaction à la ninhydrine.

a) Traitement des échantillons

aa) Oxydation par l'acide performique (79) : l'échantillon est traité à l'acide performique, puis hydrolysé en présence de HCl 6,15 N à 107°C, pendant 24, 48, 72, 96 h. Les résidus cystine et cystéine sont transformés en acide cystéique, et les résidus méthionine en méthionine sulfoxydes.

ab) Oxydation par l'air (103) : l'échantillon est directement hydrolysé, puis oxydé par l'air. Les résidus cystéine sont transformés en 1/2 cystine, reconnaissables sur le chromatogramme. Les résidus méthionine demeurent intacts.

ac) Détermination du tryptophane (61) : l'hydrolyse en présence de HCl dégrade le tryptophane. Pour la détermination de cet acide aminé, l'hydrolyse se fait pendant 24 h dans une solution d'acide méthane sulfonique 3N, tryptamine 0,2%.

b) Chromatographie

Les échantillons oxydés et hydrolysés sont chromatographiés sur une colonne de résine (Beckman AA15) de 56 cm de long. Les tampons utilisés pour l'élution sont :

- Tampon citrate de Na 0,2 N, pH 3,28
- Tampon citrate de Na 0,2 N, pH 4,25
- Tampon citrate de Na 1,2 N, pH 6,65.

A la sortie de la colonne, l'éluat réagit avec une solution de ninhydrine 2%, hydrantine 0,0625% dans du diméthyl sulfoxyde (3 v), acétate de lithium 4 M (1 v) (78). La réaction colorimétrique est lue à DO₅₇₀ et à DO₄₄₀. L'isotherme est à 55°C. L'analyse dure 220 min. Pour la détermination du tryptophane, l'hydrolysate est chromatographié sur une colonne de résine (Beckman PA 35) de 12 cm de long. La durée d'analyse est de 105 min (61).

c) Interprétation des données

L'interprétation des données fournies par le chromatogramme est faite par la méthode de la surface du triangle décrite dans le manuel Beckman 'Model 120 C, Amino Acid Analyzer' (pp. 9.2-9.12). On standardise les analyses à l'aide d'un mélange de calibration (1 μ mole de chaque acide aminé par analyse-calibration) selon la méthode décrite dans le manuel précité. Pour

chaque acide aminé, les valeurs en μ moles trouvées sont exprimées sur un tableau en fonction du temps d'hydrolyse. La valeur finale relative de chaque acide aminé est déterminée de la façon suivante :

- La sérine et la thréonine se décomposent pendant l'hydrolyse; il existe une fonction linéaire entre le logarithme de la concentration et le temps; une extrapolation au temps 0 donne la valeur réelle en μ moles de ces acides aminés.
- Pour la valine, la leucine et l'isoleucine, l'hydrolyse, incomplète au début, se développe avec le temps selon une courbe asymptotique. On détermine graphiquement cette asymptote, qui correspond à la quantité réelle de ces acides aminés, exprimée en μ moles.
- Pour les acides aminés restants, on établit la moyenne des valeurs trouvées.

d) Détermination de la valeur absolue des résidus acides aminés

On choisit l'alanine (Ala), acide aminé stable, dont on fixe arbitrairement le nombre de résidus en fonction du nombre total de résidus trouvé et du PM de la protéine analysée. On détermine le rapport f :

$$f = \frac{\mu\text{moles Ala trouvés expérimentalement}}{\mu\text{moles Ala fixés arbitrairement}}$$

On divise alors par f toutes les autres valeurs trouvées expérimentalement pour les autres acides aminés. On répète l'opération pour d'autres valeurs fixées arbitrairement de résidus Ala jusqu'à ce que la quantité

$$\Delta = \sum (\text{nombre de résidus de chaque acide aminé trouvé expérimentalement et corrigé par f}$$

- nombre de résidus de chaque acide aminé arrondi au nombre entier le plus proche) soit minimale. L'ensemble du nombre de μ moles de chaque acide aminé, déterminé par ce Δ minimum, reflète la composition globale la plus probable pour la protéine analysée.

1.2.2.27. Immunoélectrophorèse

La technique est celle de Scheidegger (95). Sur des lames recouvertes par la même gélose que celle décrite pour le test d'Ouchterlony (87), on ménage à l'aide d'un emporte-pièce, deux trous qui recevront les antigènes ainsi qu'une fente médiane destinée à l'antisérum. Les lames renfermant les antigènes sont soumises à un courant constant de 6 V/cm; le tampon d'électrophorèse est le même que celui utilisé pour dissoudre l'agarose. Après 30 min, on aspire la bande de gélose découpée préalablement et on remplit la fente obtenue avec l'antisérum adsorbé.

Après 24 h de diffusion, les lames sont traitées de la même façon que celles obtenues par immunodiffusion.

1.2.2.28. Point isoélectrique de la protéine capsidique

Cette détermination a été faite par isoélectrofocalisation selon la méthode de Vesterberg et Svensson (116).

Une colonne LKB d'une capacité de 110 ml est préparée conformément aux instructions données par le fabricant. La colonne contient 3% d'ampholytes, pour des pH compris entre 7 et 10, en gradient de saccharose de 0 à 50%.

2 mg de protéine capsidique sont introduits dans la solution légère du gradient. Le liquide de cathode est une solution de 0,2% d'éthylène diamine, saccharose 52%; le liquide d'anode est une solution de H_3PO_4 1%.

L'électrophorèse se fait à 8°C avec un voltage constamment réglé pour que la puissance ne dépasse pas 2,5 W. Dans nos conditions d'expérience, l'intensité se stabilise après 72 h environ.

Les fractions sont alors récoltées ($v = 2$ ml) et leur pH mesuré; la position de la protéine capsidique est révélée par la DO_{280} et par une réaction de précipitation à l'aide d'un antisérum. Dans ce but, 25 μ l de chaque fraction est incubé 6 h à 37°C en présence de 200 μ l d'antisérum adsorbé dilué 1 : 8; la position de la protéine capsidique est appréciée par la réaction de précipitation.

1.3 RESULTATS

1.3.1. Critères de pureté

Les préparations de bactériophage $\mu 2$ ont été soumises à plusieurs contrôles pour en vérifier la pureté :

a) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS

La Figure 6 montre deux gels obtenus à partir d'une préparation de phage $\mu 2$ (a) et d'une préparation de phage R17 (b), bactériophage également mâle-spécifique à ARN.



La comparaison des deux gels permet de conclure que les deux bactériophages sont de constitution voisine. Ils possèdent l'un et l'autre une protéine capsidique abondante ('coat protein') ainsi qu'une protéine de PM plus élevée, présente en faible quantité et qui correspond à la protéine de maturation du bactériophage R17; pour le phage $\mu 2$, nous l'appellerons aussi protéine de maturation, par analogie. Nous verrons au cours de cette étude que le bactériophage $\mu 2$ est très voisin des autres bactériophages mâle-spécifiques à ARN. Nous constatons en outre que les deux préparations phagiques sont pures : la méthode utilisée ne montre pas de protéine contaminante.

Fig. 6. Electrophorèse en gel d'acrylamide-SDS des phages $\mu 2$ (a) et R17 (b). Les bandes majeures correspondent à la protéine capsidique et les bandes mineures à la protéine de maturation.

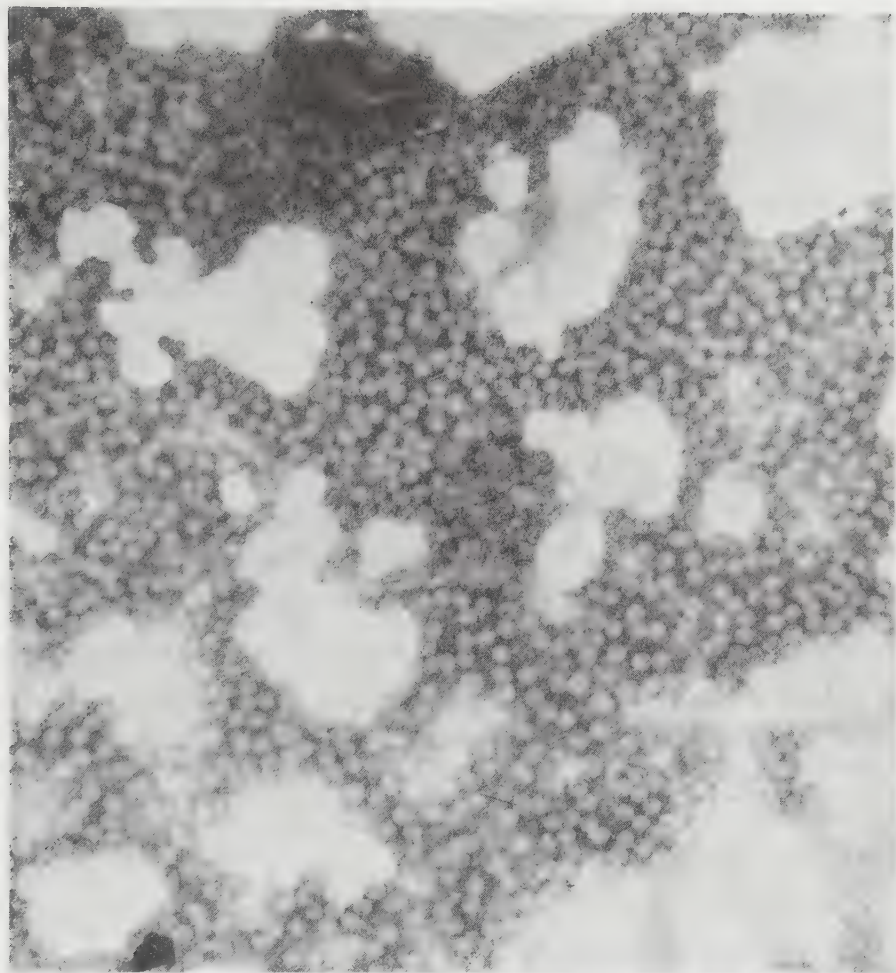


Fig. 7. Micrographie obtenue au microscope électronique d'une préparation purifiée de phages $\mu 2$ (coloration négative). Les taches claires sont dues à des artefacts de coloration. Grossissement : 80'000.

b) Sédimentation

Lors de la détermination du coefficient de sédimentation (1,3,5) les photographies prises grâce à l'optique Schlieren montrent un pic net et symétrique; on ne note pas de pics secondaires. Cette technique permet ainsi de contrôler l'homogénéité des particules phagiques.

c) Microscopie électronique

La Figure 7 est l'agrandissement d'une micrographie du bactériophage $\mu 2$ prise au microscope électronique. Cet agrandissement suggère les conclusions suivantes :

- le bactériophage $\mu 2$ a le même aspect morphologique globulaire que les autres bactériophages mâle-spécifiques à ARN;
- on ne remarque pas de contaminations;
- le nombre de particules vides (intérieur sombre en coloration négative) est limité.

d) Spectre UV

La Figure 8 représente le spectre d'absorption en rayons ultraviolets des phages $\mu 2$ et R17. La ressemblance entre les deux spectres est frappante. On constate que le bactériophage $\mu 2$ montre une DO_{260} supérieure à la DO_{280} ; en effet, environ 30% du poids total de la particule est constitué d'ARN (1,3,10).

Le rapport $\frac{DO_{260}}{DO_{280}}$ est constant pour une préparation purifiée de bactériophage, ce qui nous permet de déterminer rapidement le degré de pureté des préparations.

Pour le bactériophage $\mu 2$, ce rapport est de 1,78.

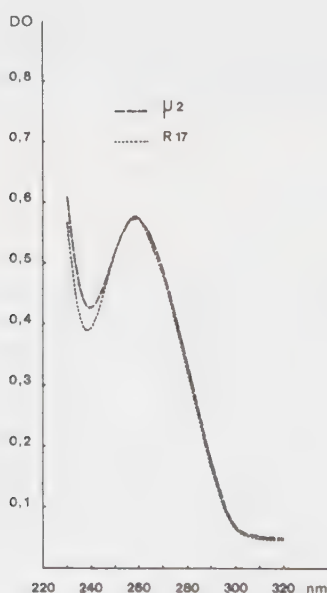


Fig.8. Spectre UV des phages $\mu 2$ et R17.

1.3.2. Critères d'identité

Lorsqu'on veut déterminer les caractéristiques d'une particule virale au cours d'une étude qui s'étend sur une période prolongée, il faut s'assurer, dans les limites du possible, que la particule infectieuse analysée correspond à la particule originelle. C'est ce que nous avons fait régulièrement en contrôlant les propriétés suivantes :

- le caractère mâle-spécifique,
- la présence des deux protéines phagiques (par électrophorèse en gel d'acrylamide-SDS),
- le rapport DO_{260}/DO_{280} ,
- l'identité immunologique à l'aide de réactions croisées avec des anti-sérums spécifiques et des phages provenant d'Angleterre (Enteric Reference Laboratory, Colindale, Londres).

En outre, pour limiter les risques de contamination par des particules virales étrangères, nous avons limité le nombre de suspensions mères.

1.3.3. Absorption spécifique

Déterminée par la méthode des pesées, cette absorption est de :

$$7,7 \text{ OD}_{260}/\text{mg} \pm 0,5$$

Cette valeur est semblable à celles trouvées par d'autres auteurs pour des bactériophages mâle-spécifiques à ARN : 7,6 à 8,2 $\text{OD}_{260}/\text{mg}$ (102).

1.3.4. Action de quelques enzymes sur l'infectiosité du bactériophage $\mu 2$

Certaines enzymes telles la trypsine, la ribonucléase et la désoxyribonucléase exercent-elles un effet sur l'infectiosité du bactériophage $\mu 2$? Le Tableau I résume nos recherches et les résultats obtenus.

Tableau I

Action de quelques enzymes sur l'infectiosité du phage $\mu 2$

Expérience	Phage $\mu 2$	RNAse	DNAse	Trypsine	Titre (p.i./ml)
A	+	-	-	-	$2,0 \times 10^{12}$
B	+	-	+	-	$2,2 \times 10^{12}$
C	+	+	-	-	$1,9 \times 10^{12}$
D	+	-	-	+	$2,3 \times 10^{12}$
E	+	+	-	+	$2,5 \times 10^{12}$
F	+	+	+	+	$1,9 \times 10^{12}$
G	-	+	+	+	-

Les essais A et G sont les témoins de l'expérience. L'essai G montre plus particulièrement qu'il n'y a pas eu de contamination par des bactériophages au niveau des solutions enzymatiques. L'essai B fait ressortir que la DNAse n'a aucun effet sur l'infectiosité du bactériophage $\mu 2$, ce qui est normal puisque le génôme de ce phage est constitué par de l'ARN (18). L'essai C exécuté avec la

RNAse apporte lui aussi un résultat qui n'est pas surprenant; en effet, d'autres bactériophages mâle-spécifiques à ARN se sont montrés insensibles à l'action de cet enzyme (44). Il est vraisemblable que la capsidie protéinique constitue pour le génôme une bonne protection contre l'attaque de cette enzyme. Par ailleurs, des recherches à l'aide de mutants de phages du même type ont montré que la présence de la protéine de maturation est indispensable pour la résistance à la RNAse (6, 42, 66). Dans l'essai D, la trypsine n'a aucun effet sur l'infectiosité du phage $\mu 2$, résultat confirmé par les essais E et F. L'hypothèse que la trypsine pourrait provoquer un affaiblissement de la capsidie et rendre ainsi le génôme exposé à l'action de la RNAse, ne s'est pas confirmée.

1.3.5. Coefficient de sédimentation du bactériophage $\mu 2$

Le coefficient de sédimentation d'une particule peut apporter des informations sur la conformation de cette particule en fonction de sa masse. On sait que la morphologie du bactériophage $\mu 2$ est du type globulaire (18). On peut donc s'attendre à obtenir une valeur élevée du coefficient de sédimentation.

Lors de l'utilisation de l'ultracentrifugeuse analytique Beckman, Spinco, Modèle E, les conditions expérimentales ont été les suivantes : vitesse de rotation du rotor : 34.000 TPM, température stabilisée à 20,2°C, bar angle : 60°, photographies toutes les 4 min avec un temps de pose de 5 sec. Six photographies (Figure 9) ont été prises au moyen de l'optique Schlieren. Le pic unique et symétrique montre la pureté et l'homogénéité de la préparation.

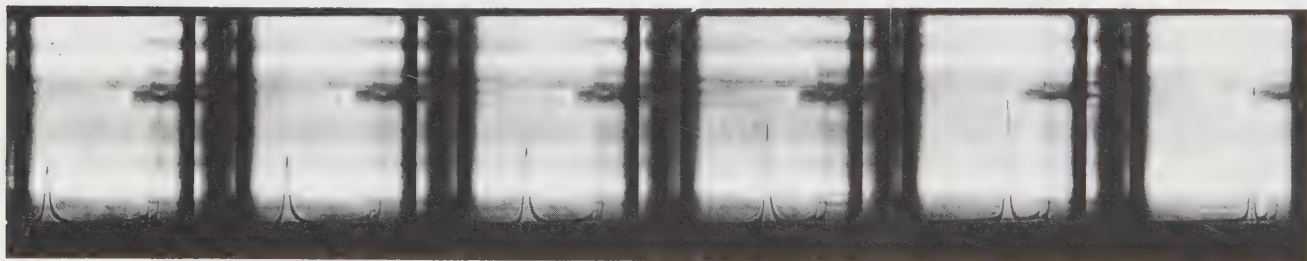


Fig. 9. Détermination du coefficient de sédimentation du phage $\mu 2$. Photographies prises pendant l'ultracentrifugation grâce à l'optique Schlieren.

Sur les agrandissements obtenus, nous avons mesuré :

- IR : la distance entre une origine arbitraire et la référence intérieure Ri
- OR : la distance entre la même référence arbitraire et Re
- P : la distance entre la même référence arbitraire et le pic.

On connaît par ailleurs :

- r_i : la distance entre l'axe du rotor et Ri = 5,70 cm
- r_e : la distance entre l'axe du rotor et Re = 7,30 cm

Les mesures ont été faites trois fois et les valeurs rapportées dans le Tableau II expriment des moyennes.

Tableau II
Détermination du coefficient de sédimentation du bactériophage μ2.
Moyenne des mesures estimées

Photo No	IR	OR	ΔR =OR-IR	P	$\frac{P-IR}{G}$	$\frac{r}{G} = \frac{P-IR}{G} + r_i$	ln r	t min
1	-9,077*	25,053	-	2,500	5,43	62,43	1,831	0
2	1,135	35,272	34,137	15,786	6,88	63,88	1,855	4
3	3,520	37,618	34,098	21,341	8,37	65,37	1,878	8
4	2,591	36,728	34,137	23,674	9,90	66,90	1,901	12
5	3,043	37,183	34,140	27,476	11,47	68,47	1,924	16
6	3,113	37,248	34,135	30,947	13,07	70,07	1,947	20

Abréviations : cf texte * estimation par calcul

Des données du Tableau II, on déduit les moyennes que voici :

$\Delta \bar{R} = 34,130 \text{ mm}$ $\Delta \bar{r} = 16,0 \text{ mm}$

D'où le grossissement G

$G = \frac{\Delta \bar{R}}{\Delta \bar{r}} = 2,13$

Dans la Figure 10 les valeurs de ln(r) ont été reportées en fonction du temps. De la pente de la droite, on déduit :

$K = \frac{\ln(r_2) - \ln(r_1)}{t_2 - t_1} = \frac{0,116}{1200} = 9,7 \times 10^{-5} = s \omega^2$

$\omega = 34.000 \text{ TPM}$ $\omega^2 = 1,27 \times 10^7 \text{ (rd/sec)}^2$

Donc $s = 7,6 \times 10^{-12} \text{ sec}$ ou 76 S.

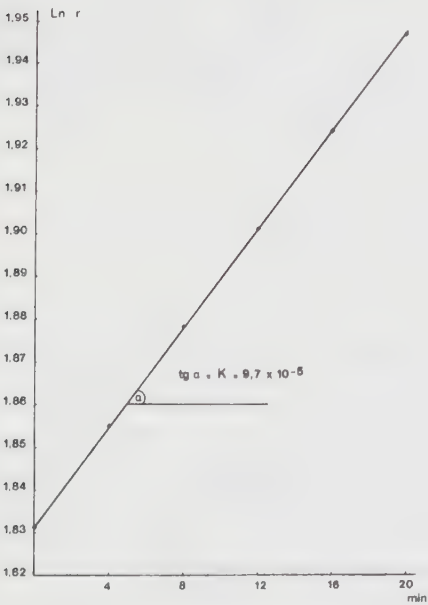


Fig. 10. Détermination du coefficient de sédimentation du phage μ2. Explications : voir texte.

Le tampon SSC utilisé étant assez dilué pour être assimilé à de l'eau, le coefficient de sédimentation du bactériophage $\mu 2$ peut être estimé à 76 S, valeur élevée qui se trouve en accord avec la morphologie globulaire observée par microscopie électronique.

Compte tenu de la précision de la méthode, la valeur trouvée est proche de celle de Ceppellini et al. : 78 S (18).

1.3.6. Densité du bactériophage $\mu 2$

L'épreuve est réalisée par ultracentrifugation dans un gradient de densité de CsCl. La Figure 11 illustre l'une des trois déterminations que nous avons faites. La densité du bactériophage $\mu 2$ est estimée à $1,42 \pm 0,01$. Ce résultat est identique à celui de Ceppellini et al. (18).

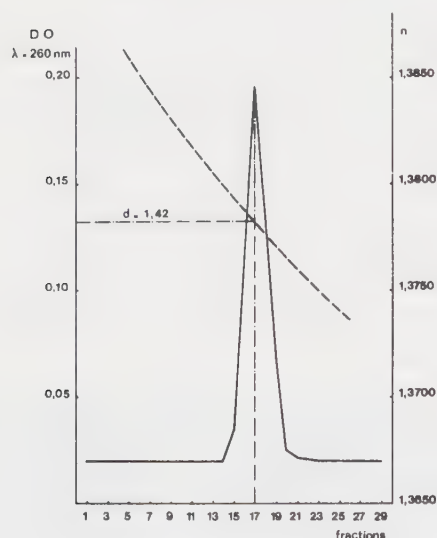


Fig. 11. Détermination de la densité du phage $\mu 2$: la suspension phagique est centrifugée en gradient de CsCl. n = indice de réfraction correspondant à une densité donnée de la solution de CsCl.

1.3.7. Poids moléculaire de la protéine capsidique du bactériophage $\mu 2$

L'électrophorèse sur gel d'acrylamide en présence de SDS d'une préparation de bactériophage $\mu 2$ montre l'existence d'une sous-unité protéinique, la protéine capsidique. La détermination du poids moléculaire de cette sous-unité est faite par électrophorèse sur gel d'acrylamide-SDS, selon la méthode d'Ahmad-Zadeh et al. (5). Les gels utilisés sont des gels de polyacrylamide à 15%. Comme préparations de référence, nous avons choisi :

l'ovalbumine	PM = 43.000
l'alcool deshydrogénase	PM = 37.000
la β -lactoglobuline	PM = 18.400
l'insuline	PM = 5.700

Le poids moléculaire est déterminé sur deux séries de 8 gels. On dépose sur chaque gel 100 μ l du mélange composé de :

- 10 volumes d'ovalbumine à 2 mg/ml
- 20 volumes d'ADH à 1 mg/ml
- 2 volumes de β -lactoglobuline à 2 mg/ml
- 1 volume d'insuline à 2 mg/ml
- 25 volumes d'une préparation de $\mu 2$ à 1 mg/ml
- 5 volumes de mercaptoéthanol.

La Figure 12 offre une courbe qui exprime le rapport entre les logarithmes des PM et les mobilités correspondantes : cette courbe est en réalité une droite, ce qui confirme la relation de linéarité entre ces deux paramètres (97). Sur le graphique, le PM de la protéine capsidique du bactériophage $\mu 2$ se situe à 12.800.

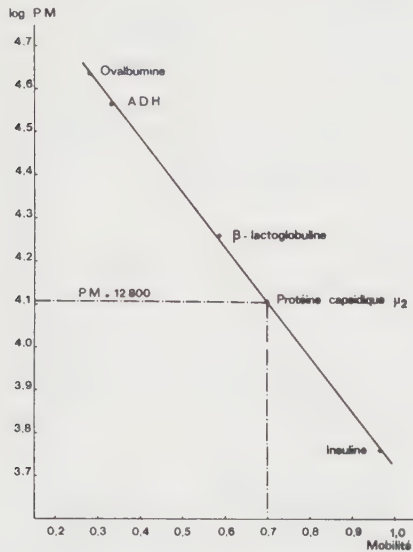


Fig. 12. Détermination du poids moléculaire de la protéine capsidique du phage $\mu 2$ par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS 15%.

Les données de nos mesures ont été traitées par l'ordinateur CDC 3800 de l'Université de Genève : la valeur du PM de cette protéine peut être fixée à 12.850.

Certains auteurs (61,119,120,123) ont estimé que le PM de la protéine capsidique est d'environ 14.200, du moins pour des bactériophages mâle-spécifiques à ARN tels que MS2, R17 et fr. Etant donné que cette valeur a été obtenue soit par électrophorèse sur gel d'acrylamide, soit par détermination de la composition ou même de la séquence des acides aminés, on peut se demander si le chiffre que nous observons pour $\mu 2$ est réellement inférieur ou si la différence est imputable à la technique utilisée. Pour vérifier l'une ou l'autre de ces hypothèses, nous avons déterminé le PM de la protéine capsidique du bactériophage R17 en nous plaçant dans les mêmes conditions expérimentales que celles décrites pour $\mu 2$. Après traitement des données par l'ordinateur, nous obtenons pour le PM de la protéine capsidique de R17 la valeur de 12.400.

Etant donné que les valeurs trouvées pour les bactériophages $\mu 2$ et R17 sont pratiquement semblables, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

- le PM de la protéine capsidique du bactériophage $\mu 2$ est du même ordre de grandeur que celui des protéines capsidiques des phages apparentés;
- la différence observée entre nos valeurs et celle trouvée par d'autres auteurs (notamment par la détermination de la séquence des acides aminés, méthode plus précise que la nôtre) s'explique probablement par le choix de la technique et plus particulièrement par le choix des préparations de référence;
- nous verrons plus loin qu'en établissant la composition globale en acides aminés (1,3,13), nous obtenons une valeur qui se rapproche plus de celles trouvées par les séquences chez d'autres phages à ARN.

1.3.8. Poids moléculaire de la protéine de maturation de $\mu 2$

La détermination du PM de la protéine de maturation du bactériophage $\mu 2$ est faite par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% en présence de SDS. Les préparations de référence utilisées sont :

la fumarase	PM 49.000
l'ovalbumine	PM 43.000
l'ADH	PM 37.000
la β -lactoglobuline	PM 18.400

Sur chaque gel ont été déposés 100 μ l du mélange suivant :

- 3 volumes de fumarase à 500 μ g/ml
- 1 volume d'ovalbumine à 2 mg/ml
- 1 volume d'ADH à 2 mg/ml
- 1 volume de β -lactoglobuline à 4 mg/ml
- 8 volumes d'une préparation de protéine de maturation à 250 μ g/ml
- 5 volumes de mercaptoéthanol.

Pour cet essai, nous avons utilisé 2 séries de 12 gels.

Nous avons, dans la Figure 13, reporté les valeurs des logarithmes des PM en fonction de la mobilité. Graphiquement, on trouve la valeur de 40.700 pour le PM de la protéine analysée. Le traitement des données par l'ordinateur CDC 3800 donne, pour le PM de la protéine de maturation du bactériophage $\mu 2$, la valeur de 40.500. Pour la protéine de maturation du bactériophage R17, nous avons obtenu un PM de 40.400 (2, 3, 6).

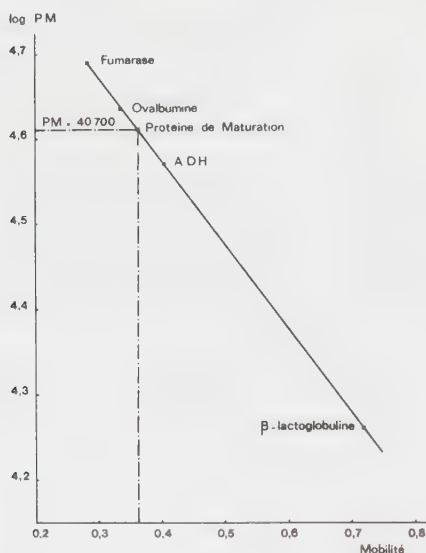


Fig. 13. Détermination du poids moléculaire de la protéine de maturation du phage $\mu 2$ par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS 10%.

Il n'y a donc pas de différence significative entre les PM des protéines de maturation des deux phages. Il est cependant indiqué de faire quelques réserves sur les valeurs absolues trouvées, car les résultats dépendent étroitement du choix des préparations de référence.

1.3.9. Poids moléculaire de l'acide ribonucléique du bactériophage $\mu 2$

Cette détermination est faite par électrophorèse en gel de polyacrylamide 2,6%, en présence de SDS. Les préparations de référence sont :

le virus de la polio	PM de l'ARN : 2×10^6
les ribosomes	PM de l'ARN 23 S : $1,1 \times 10^6$
	PM de l'ARN 16 S : $5,6 \times 10^5$

L'échantillon de phage $\mu 2$ utilisé a une concentration de 2 mg/ml. Les essais comportent 3 séries de 8 gels. Le schéma expérimental suivant est adopté :

Gel 1 :	40 μ l de phage $\mu 2$
Gel 2 :	40 μ l de phage $\mu 2$
Gel 3 :	20 μ l de ribosomes (50 mg/ml)
Gel 4 :	20 μ l de ribosomes (50 mg/ml)
Gel 5 :	200 μ l de virus de la polio
Gel 6 :	200 μ l de virus de la polio
Gel 7 :	200 μ l de virus de la polio
Gel 8 :	200 μ l de SDS 1%.

Les échantillons sont traités pendant 1 min à 100°C en présence de SDS (1%) et de mercaptoéthanol (5%); sous l'effet du détergent et de l'agent réducteur, les particules virales et ribosomiques se dissocient; pendant l'électrophorèse, les protéines, migrant plus vite que les acides nucléiques qui ont un PM plus élevé, sortent du gel; à la fin de l'électrophorèse, seules les bandes d'acide nucléique restent sur les gels.

Dans la Figure 14, la courbe exprime les logarithmes des PM des ARN en fonction de leur mobilité. Sur le graphique, le PM de l'ARN du phage $\mu 2$ est compris entre $1,0$ et $1,2 \times 10^6$ nous l'estimons à $1,15 \times 10^6$.

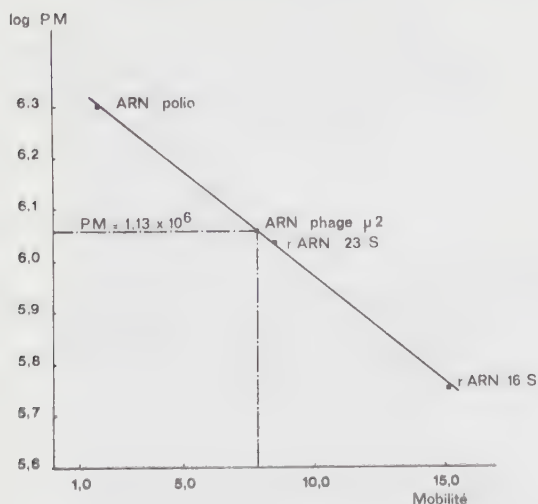


Fig. 14. Détermination du poids moléculaire de l'ARN du phage $\mu 2$ par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS 2,6%.

Cette valeur est en accord avec celles trouvées par d'autres auteurs (102) pour des phages semblables et par des techniques différentes (sédimentation, diffraction aux rayons X). Ici aussi il convient de faire certaines réserves sur la valeur absolue du résultat trouvé, les résultats obtenus avec la technique utilisée dépendant des préparations de référence; de plus, dans nos conditions,

la migration des ARN dans les gels dépend plus du volume de la molécule que de son PM.

1.3.10. Pourcentage de l'ARN dans le bactériophage $\mu 2$

Nous avons déterminé la quantité d'ARN dans différentes préparations purifiées du phage $\mu 2$ en recourant au dosage du phosphate et du ribose. Ces préparations contenaient 4 mg/ml de phage. Nous avons aussi, avec les mêmes suspensions, déterminé le taux en protéines par la méthode de Lowry et celle du biuret. La Figure 15 présente un dosage de phosphate : la micro-méthode utilisée et les marges de concentration adoptées fournissent une bonne relation linéaire entre la concentration en phosphates et la DO_{660} . Le pourcentage d'ARN présent est calculé suivant la formule :

$$\% \text{ ARN} = \frac{\text{Quantité d'ARN}}{\text{Quantité d'ARN} + \text{Quantité de protéines}}$$

La moyenne de 4 déterminations donne la valeur suivante :

$$\% \text{ ARN du bactériophage } \mu 2 = 29,0 \pm 0,2$$

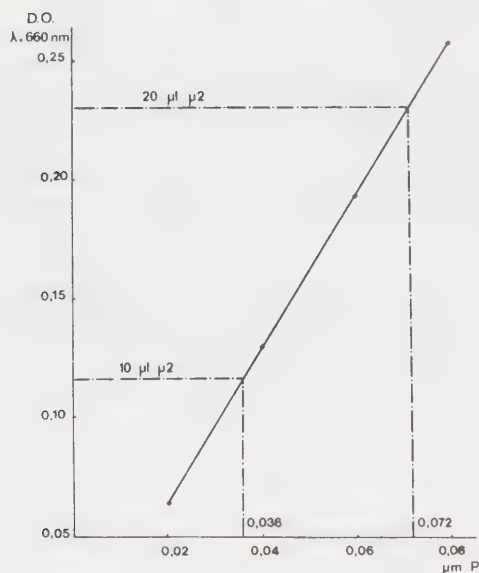


Fig. 15. Dosage du phosphate dans une préparation de phage $\mu 2$. La courbe étalon est établie à partir d'une solution de KH_2PO_4 et contrôlée à l'aide d'un échantillon contenant une quantité connue de t-ARN.

1.3.11. Poids particulaire (PP) du bactériophage $\mu 2$

Ayant déterminé le % en ARN ainsi que le PM du génôme phagique, on peut estimer le PP de la particule infectieuse entière selon la relation suivante :

$$PP_{\mu 2} = \frac{PM_{\text{ARN}}}{\% \text{ ARN}}$$

Nous trouvons alors pour le PP de la particule phagique $\mu 2$:

$$PP_{\mu 2} = 3,8 \pm 0,2 \times 10^6$$

Cette méthode ne fournit qu'une approximation, surtout à cause de l'imprécision du dosage des protéines. Toutefois, la valeur que nous trouvons correspond aux chiffres cités dans la littérature pour d'autres bactériophages de

ce type (102). On notera d'ailleurs que, pour un même bactériophage, les valeurs de PP sont assez différentes d'un auteur à l'autre (102).

1.3.12. Etude de la parenté immunologique entre le bactériophage $\mu 2$ et d'autres bactériophages mâle-spécifiques à ARN

Cette étude est réalisée par immunodiffusion en agarose (méthode d'Ouchterlony) et par neutralisation du pouvoir infectieux.

a) Immunodiffusion en agarose

La Figure 16 reproduit les résultats d'immunodiffusion en agarose.

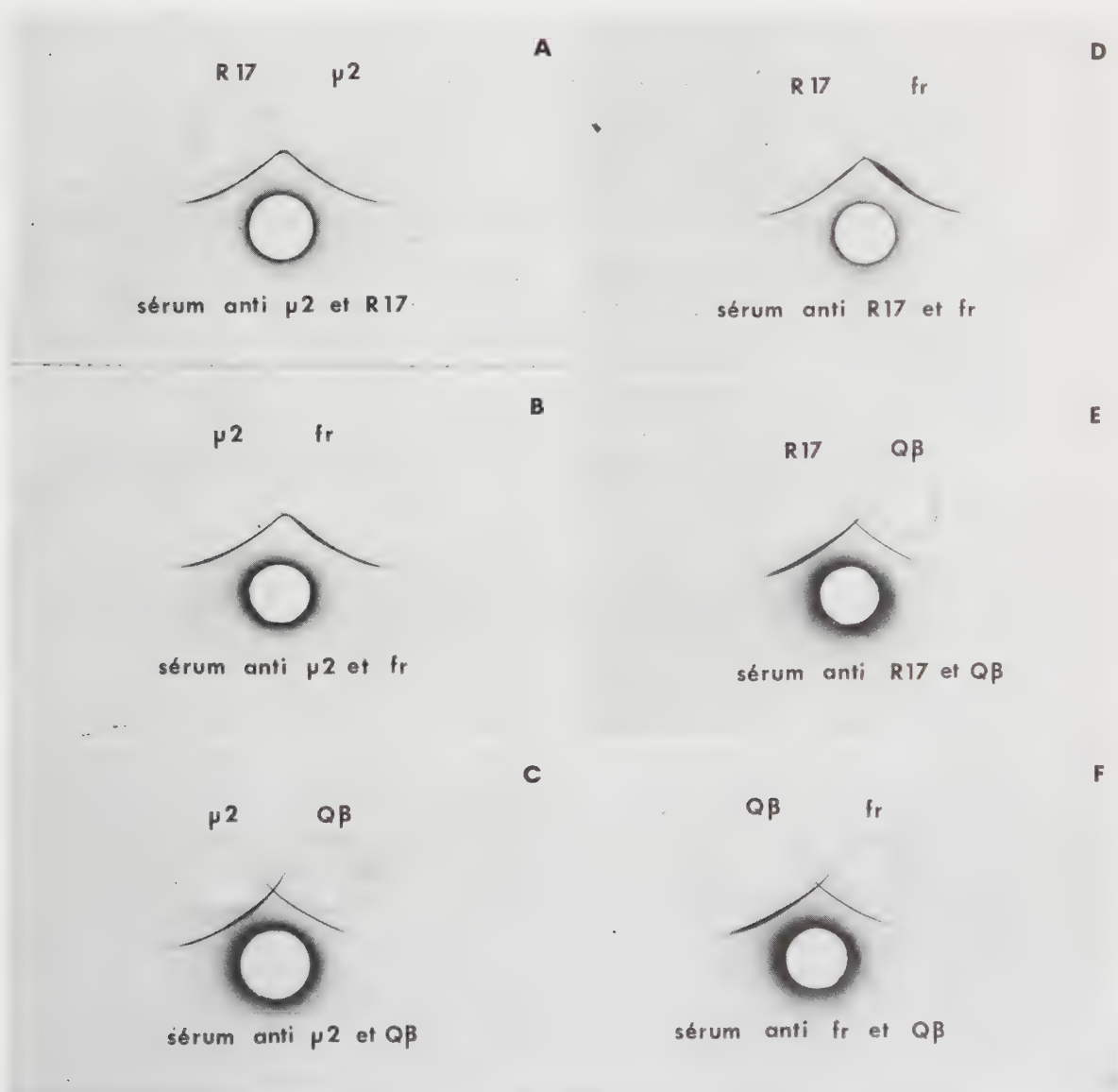


Fig. 16. Etude de la parenté immunologique entre le phage $\mu 2$ et les phages R17, fr, Q β (technique d'Ouchterlony). Concentration des antigènes : 1 mg/ml. Dilution des antisérums : 1/8.

Voici ce qui ressort de l'examen de la Figure 16 :

Lame A : il existe une relation d'identité immunologique entre les phages $\mu 2$ et R17. Les lignes de précipitation se rejoignent et se confondent complètement. Les deux phages possèdent donc des déterminants antigéniques communs.

Lame B : les lignes de précipitation se rejoignent et se confondent partiellement. Il y a parenté immunologique entre les phages $\mu 2$ et fr. Ce dernier possède des déterminants antigéniques communs à $\mu 2$ et des déterminants supplémentaires distincts.

Lame C : les lignes de précipitation se croisent. Une relation immunologique entre $\mu 2$ et Q β fait défaut.

Lame D : il existe une parenté immunologique entre fr et R17. fr possède des déterminants antigéniques supplémentaires.

Lame E : il n'y a pas de relation immunologique entre R17 et Q β .

Lame F : il n'y a pas non plus de relation immunologique entre fr et Q β .

Les essais témoins, exécutés à l'aide d'antisérums adsorbés par les antigènes homologues n'ont pas montré de lignes de précipitation décelables.

b) Neutralisation du pouvoir infectieux

Le Tableau III résume les résultats obtenus par cette méthode. La constante de neutralisation K de chaque antisérum contre l'antigène homologue est indiquée dans la partie I du Tableau. Dans la partie II, sont indiqués les rapports c, définis comme suit (AS : antisérum; AG : antigène) :

$$c = \frac{\text{constante de neutralisation d'un AS donné contre un AG donné}}{\text{constante de neutralisation d'un AS donné contre l'AG homologue.}}$$

Tableau III

Détermination du pouvoir infectieux des bactériophages par les antisérums.
Explications : voir texte

	I	II			
Sérum anti	K	Antigènes			
		R17	$\mu 2$	fr	Q β
R17	13.700	1,0	0,67	0,60	-
$\mu 2$	14.540	0,81	1,0	0,88	-
fr	11.730	0,73	0,82	1,0	-
Q β	4.100	-	-	-	1,0

Ces résultats confirment ceux obtenus par immunodiffusion, à savoir la parenté qui existe entre les phages $\mu 2$, fr et R17, ainsi que l'absence de relations immunologiques entre ces phages et Q β .

1.3.13. Composition globale en acides aminés de la protéine capsidique du bactériophage $\mu 2$

Le Tableau IVa présente les valeurs relatives en μ moles de chaque acide aminé, tandis que la Figure 17 offre un graphique construit pour déterminer la valeur de chaque acide aminé; il exprime, en fonction du nombre de résidus Ala, la variation des $\Delta = \sum$ (nombre de résidus de chaque acide aminé déterminé expérimentalement - nombre de résidus de chaque acide aminé arrondi à l'entier le plus proche). Pour 16 résidus Ala, correspondant à un facteur $f = 0,4502$, la valeur de Δ atteint un minimum. En corrigeant le nombre

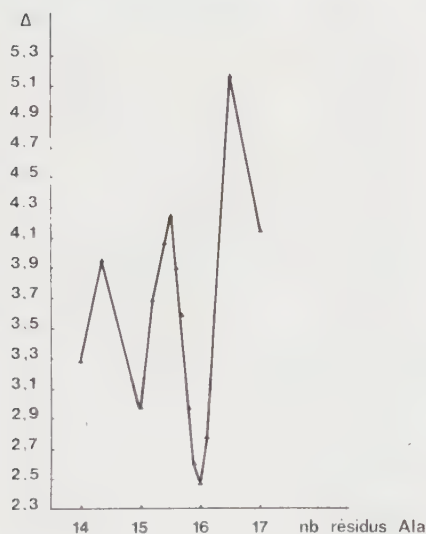


Fig. 17. Variation en fonction du nombre de résidus alanine des $\Delta = \sum$ (nombre de résidus de chaque acide aminé déterminé expérimentalement - nombre de résidus de chaque acide aminé arrondi à l'entier le plus proche). Explications : voir texte.

de chaque acide aminé par ce facteur f (Tableau IV b), nous obtenons, avec la plus grande probabilité, la composition globale en acides aminés de la protéine capsidique (Tableau IV c). A partir de ces données, nous pouvons calculer le PM de cette protéine (14.400).

Notre détermination de la composition en acides aminés n'est certes pas aussi précise que celle fournie par la séquence, mais elle suscite néanmoins quelques remarques.

- Les résultats obtenus semblent relativement sûrs; ils reposent en effet sur 12 analyses et sur quatre temps d'hydrolyse pour l'estimation des acides aminés critiques (thréonine, sérine, valine, leucine, isoleucine).
- La protéine analysée contient un grand nombre de résidus valine, leucine et isoleucine, ce qui expliquerait dans une certaine mesure la faible solubilité de la protéine dans les solvants aqueux usuels (moins de 1 mg/ml).
- L'estimation du PM faite par la méthode utilisée paraît plus correcte que celle déterminée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, car elle ne dépend pas directement du choix arbitraire des préparations de référence. On relèvera d'ailleurs que la valeur trouvée (14.400) se rapproche plus des valeurs déterminées pour les autres protéines capsidiques des phages du même type (PM = 14.200).

Tableau IV

Tableau récapitulatif pour la détermination de la composition globale en acides aminés de la protéine capsidique du phage $\mu 2$.

b : valeur de a corrigée par f,

c : valeur de b arrondie à l'entier le plus proche

Explications : voir texte

Acide aminé	(a) Quantité relative en μ moles	(b) Quantité absolue en μ moles	(c) Composition en acides aminés
Lysine	2,80	6,21	6
Histidine	—	—	—
Arginine	1,93	4,29	4
Tryptophane	0,87	1,93	2
Méthionine	0,88	1,96	2
Ac. aspartique	7,20	15,99	16
Thréonine	3,97	8,82	9
Sérine	6,20	13,72	14
Ac. glutamique	5,44	12,09	12
Proline	3,04	6,75	7
Glycine	4,98	11,06	11
Alanine	7,20	16	16
Valine	6,74	14,97	15
Isoleucine	3,63	8,06	8
Leucine	3,74	8,31	8
Tyrosine	1,02	2,26	2
Phénylalanine	1,86	4,12	4
Cystéine	0,99	2,19	2
Nombre total d'acides aminés			138
PM probable : 14.387			

1.3.14. Nombre de molécules de protéines de maturation par particule phagique de $\mu 2$

750 μ l d'une suspension de phages $\mu 2$ marqués au C^{14} (au total 250.000 CPM) sont dialysés contre du SDS 1%, mercaptoéthanol 1%, et incubés 2 min à 100°C. L'échantillon est ensuite appliqué sur un gel d'acrylamide 10%, SDS 0,1%, de 8 cm de long et de 1 cm de diamètre. Après une électrophorèse de 7 h (15 mA, 70 V), le gel est coupé en tranches et la radioactivité déterminée.

Dans la Figure 18, le pic majeur correspond à la protéine capsidique et le pic mineur à la protéine de maturation. Pour déterminer le nombre de protéines de maturation par particule phagique, nous avons comparé le % expérimental des CPM du pic mineur par rapport à la somme des CPM des deux pics, au pourcentage théorique calculé en fonction des PM des deux protéines. Nous avons admis que le nombre de CPM était proportionnel à la quantité de protéine marquée et que la capside contenait 180 copies de protéine capsidique (77).

Le PM de la protéine de maturation étant de 40.000 et celui de la protéine capsidique étant de 14.400, on arrive pour 1 (a), 2 (b), 3 (c) copies de protéine de maturation par particule phagique, aux pourcentages théoriques suivants :

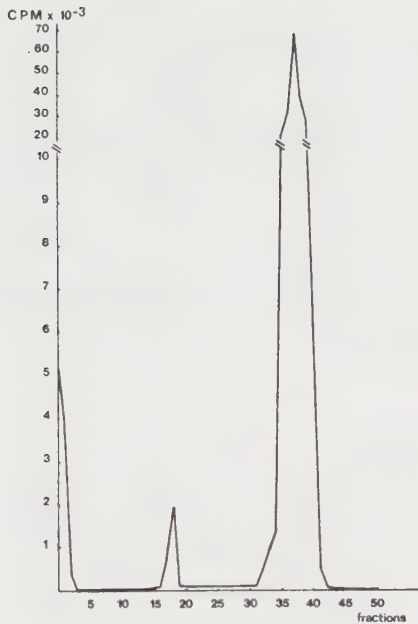


Fig. 18. Détermination du nombre de molécules de protéine de maturation par particule phagique de $\mu 2$. Explications : voir texte.

$$a) \frac{1 \times 40.000}{40.000 + (180 \times 14.400)} = 1,52$$

$$b) \frac{2 \times 40.000}{80.000 + (180 \times 14.400)} = 3,03$$

$$c) \frac{3 \times 40.000}{120.000 + (180 \times 14.400)} = 4,55$$

De la Figure 18, on évalue le % expérimental à

$$\frac{\text{CPM du pic mineur}}{\text{CPM des pics mineur et majeur}} = 1,52$$

Le pourcentage expérimental est donc du même ordre que le pourcentage théorique, calculé sur la base d'une copie de protéine de maturation par particule phagique.

Il convient néanmoins d'analyser la valeur du résultat trouvé en fonction de la radioactivité mesurée au sommet du gel (Figure 18). Trois hypothèses surgissent à propos de cette radioactivité.

- Un faible pourcentage de particules phagiques ont pu résister à la dissociation par le SDS et persister au sommet du gel pendant l'électrophorèse. Notre résultat n'en reste pas moins valable puisque, dans ce cas, la proportion de CPM entre les deux pics ne varie pas.
- La radioactivité du sommet du gel proviendrait de l'ARN marqué au C^{14} . Krahn et al. (58) ont montré en effet que lors du marquage d'un phage par des acides aminés radioactifs, une partie de la radioactivité se retrouve dans l'ARN. Là encore notre détermination ne se trouve pas faussée.
- La radioactivité au sommet du gel proviendrait de la protéine capsidique ou de la protéine de maturation qui auraient formé spécifiquement des agrégats. Dans ce cas, nos résultats pourraient être faussés. Cette der-

nière hypothèse nous semble improbable, d'autant plus que la dissociation fut réalisée au moyen du SDS.

Par ailleurs, Steitz (105) a relevé qu'en solution d'urée la protéine de maturation collerait au sac à dialyse. Il est peu probable que ce phénomène puisse se produire en présence de SDS pour interférer dans le rapport des CPM entre les pics mineur et majeur.

Ainsi donc, sur la base des résultats trouvés et sous certaines réserves relevées plus haut, nous croyons pouvoir admettre que, dans une population phagique normale, chaque particule possède en moyenne une molécule de protéine de maturation.

1.3.15. Immunoélectrophorèse

Dans la Figure 19, la protéine capsidique n'a pratiquement pas migré pendant l'électrophorèse à pH 8,4. On relèvera toutefois que, dans une telle expérience, la migration d'une protéine dépend non seulement de son point isoélectrique mais aussi de phénomènes d'électroendosmose, comme aussi de la viscosité du milieu. Nos résultats permettent de conclure que la protéine capsidique que nous avons analysée n'est pas acide.



Fig. 19. Immunoélectrophorèse de la protéine capsidique du phage $\mu 2$ à pH 8,4. Concentration de l'antigène : 1 mg/ml. Dilution de l'antisérum : 1/2. L'antisérum se trouve dans la fente entre les trous contenant l'antigène. L'anode est à gauche.

1.3.16. Point isoélectrique de la protéine capsidique

Pour la protéine capsidique du bactériophage $\mu 2$, l'électrofocalisation fait admettre un point isoélectrique de 8,75 - 8,80, résultat qui confirme celui de l'immunoélectrophorèse. La protéine analysée est donc basique.

1.4 DISCUSSION

Le Tableau V réunit les valeurs trouvées pour la caractérisation physico-chimique du bactériophage $\mu 2$. Ces valeurs sont en outre comparées à celles obtenues par d'autres auteurs pour des bactériophages mâle-spécifiques à ARN. L'analyse du Tableau fait ressortir un certain nombre de constatations.

Tableau V

Comparaison entre les bactériophages $\mu 2$, R17, fr, MS2 et Q β
(Réf.: 26, 27, 32, 55, 60, 72, 88, 90, 102, 109, 120, 125)

Phage	PP $\times 10^{-6}$	S _{20,w}	d g/cm ³	DO ₂₆₀ Spéc.	o/o ARN	PM-10 ⁻⁶ ARN	Comp. en bases de l'ARN	PM protéine cap- sidique-10 ⁻³	Parenté immunologique			
									$\mu 2$	fr	R17	Q β
$\mu 2$	3, 8+0, 2	76	1, 42+0, 1	7, 7+0, 5	29	1, 1+0, 1	A 23, 8 U 27, 1 G 25, 4 C 23, 7	14, 4	+	+	+	-
fr	4, 1+0, 3 3, 6-10 ⁶	79	1, 46	-	28, 4	1, 1	A 24, 3 U 23, 7 G 27, 1 C 24, 9	14, 1	+	+	+	-
R17	4, 14 3, 6+0, 3 3, 7+0, 3	77 77 79-80	1, 43	8, 20 7, 66	34, 1-31, 7 31	1, 1+0, 1 0, 95-1, 37 1, 3	A 22, 6 23, 1 U 25, 5 25, 7 G 27, 1 26, 3 C 24, 8 24, 9	14, 2 13, 75	+	+	+	-
MS2	3, 6 3, 6	79 81	1, 422 1, 46	7, 81 8, 03	31, 5	1, 05 1, 0	A 23, 3 22, 8 U 24, 8 25, 2 G 26, 4 27, 1 C 25, 5 24, 9	14, 1				
Q β	4, 2	84	1, 439	8, 02	31	1, 5	A 22, 1 U 29, 5 G 23, 7 C 24, 7	14, 2	-	-	-	+

1.4.1. Parenté physico-chimique

Les précisions touchant le coefficient de sédimentation, la densité, le PM de la particule infectieuse, le PM de la protéine capsidique, la composition en bases nucléiques, montrent que $\mu 2$ est voisin des phages R17, f2, MS2, Q β . Contrairement à l'opinion d'autres auteurs (84,44,102), nous pensons que, compte tenu de la précision des estimations, ces paramètres ne sont pas si différents pour Q β et les autres phages. Seul le PM de l'ARN semble présenter quelque différence.

Se basant sur certaines constantes physico-chimiques telles que le coefficient de sédimentation, la densité, la composition en bases de l'ARN, certains auteurs (84,44,102) proposent une classification comprenant trois groupes. Nous renonçons à intégrer $\mu 2$ dans une telle classification. En effet, ce type de classification repose sur des critères contestables : si l'on examine, par exemple, des critères tels que (102)

groupe I	S = 79	d = 1,457
groupe II	76	1,442
groupe III	83	1,469

on s'aperçoit que MS2 (88) appartient par son coefficient de sédimentation (S = 79) au groupe I et par sa densité (d = 1,422) au groupe II. De plus, les constantes déterminées par des auteurs différents ne sont pas toujours concordantes : pour MS2, Overby et al. (88) trouvent une densité de d = 1,422, Strauss et Sinsheimer (109) une densité de d = 1,46. Nous pensons qu'une classification reposant sur un ensemble de constantes dont la valeur reste fonction des techniques utilisées ne se justifie pas.

1.4.2. Parenté immunologique

Les expériences de neutralisation du pouvoir infectieux et d'immunodiffusion en agarose montrent que $\mu 2$, fr et R17 possèdent une parenté immunologique; par contre Q β se distance de ce groupe. Ces résultats confirment ceux de Scott (96). La technique d'Ouchterlony montre que la parenté entre $\mu 2$ et R17 est plus proche que celle qui existe entre $\mu 2$ et fr, R17 et fr. Ce dernier phage semble posséder des déterminants antigéniques supplémentaires.

1.4.3. Protéine capsidique

Le Tableau VI renseigne sur la composition globale en acides aminés de la protéine capsidique de $\mu 2$ comparée à celles obtenues pour la même protéine d'autres bactériophages mâle-spécifiques à ARN.

La composition en acides aminés de la protéine capsidique des bactériophages $\mu 2$, R17, MS2, fr est relativement voisine, tandis que celle de Q β est plus différente; par exemple, la protéine de ce dernier phage ne possède aucun résidu histidine, méthionine et tryptophane, tandis que pour la protéine des autres phages n'est absente que l'histidine.

Pour $\mu 2$, on remarque une certaine quantité d'arginine et de lysine, acides aminés basiques. La technique utilisée pour la détermination de la composition en acides aminés ne nous permet pas de connaître la quantité d'asparagine et de glutamine, les résidus formés pendant l'hydrolyse étant sous la forme d'acide aspartique et d'acide glutamique. Ces valeurs auraient été intéressantes à con-

Tableau VI

Tableau comparatif de la composition globale en acides aminés de la protéine capsidique des phages $\mu 2$, Q β , R17, fr et MS2.

Pour les phages Q β , R17, fr et MS2, ces valeurs proviennent de la détermination des séquences (60, 55, 119, 120, 123)

	$\mu 2$	Q β	R17	fr	MS2
Lysine	6	7	6	7	6
Arginine	4	7	4	4	4
Histidine	-	-	-	-	-
Ac. aspartique	16	7	3	5	14
Asparagine		8	11	10	
Thréonine	9	12	9	9	9
Sérine	14	9	13	11	13
Ac. glutamique	12	5	5	6	11
Glutamine		8	6	5	
Proline	7	8	6	5	6
Glycine	11	7	9	9	9
Alanine	16	15	14	16	14
Valine	15	13	14	16	14
Méthionine	2	-	2	2	2
Isoleucine	8	4	8	6	8
Leucine	8	12	7	5	7
Tyrosine	2	4	4	4	2
Phénylalanine	4	3	4	5	4
Cystéine	2	2	2	2	2
Tryptophane	2	-	2	2	4
Total	138	131	129	129	129

naître étant donné le caractère basique de la protéine (déterminé par la mesure du point isoélectrique et par immunoelectrophorèse); cependant, en considérant la composition des protéines capsidiques des phages voisins (déterminée par la séquence), il est permis de penser que chez $\mu 2$ aussi la plupart de ces résidus se trouvent également sous forme amidée.

1.5 CONCLUSION

Notre étude fait ressortir que le bactériophage $\mu 2$ appartient, soit du point de vue physico-chimique, soit du point de vue immunologique, à la même famille que les bactériophages R17, fr et MS2; comme ces derniers, il se distingue de Q β par ses propriétés antigéniques.

Ces bactériophages ont-ils un ancêtre commun ou sont-ils les aboutissants de voies évolutives parallèles mais semblables ? Ces questions restent pour l'instant sans réponse.

DEUXIEME PARTIE

2. ETUDE SUR LA PROTEINE DE MATURATION
DU BACTERIOPHAGE R17

2.1 INTRODUCTION

Nous avons vu plus haut (Introduction) que le génôme des phages à ARN contient l'information nécessaire non seulement à la synthèse des trois protéines virales, mais aussi à la régulation de leur traduction ainsi qu'au contrôle de la réplication de l'ARN. L'étude de la protéine de maturation nous a semblé intéressante car les connaissances à son sujet sont encore fragmentaires. Kozak et Nathans (57), utilisant une préparation de phages MS2 marqués au S^{35} , ont montré que la protéine de maturation pénétrait à l'intérieur de la cellule. Krahn et al. (58) ont précisé que, au contact des fimbries sexuelles, la protéine de maturation se scindait en deux fragments : les deux polypeptides pénètrent ensuite à l'intérieur de la cellule en même temps que l'ARN. Toutefois aucun de ces auteurs n'a déterminé la fonction, soit de la protéine entière, soit de ses fragments, après la phase d'injection.

Des expériences de génétique et de reconstitution de particules infectieuses (6, 42, 48, 66) ont montré que la protéine de maturation semblait indispensable à la formation de phages infectieux. En effet, l'étude 'in vivo' de la synthèse de particules phagiques après infection par des mutants 'amber' du cistron de la protéine de maturation (42, 66), a montré que les bactériophages produits étaient incapables de s'adsorber sur les fimbries sexuelles, et que leur génôme était sensible à l'action de la RNase, bien que l'aspect morphologique des particules produites ait été semblable à celui des particules sauvages. Krahn et Paranchych (59) ont trouvé que dans une population phagique normale, seules étaient capables de s'adsorber les particules possédant la protéine de maturation. Roberts et Steitz (94) enfin, ajoutant à l'ARN viral et à la protéine capsidique une préparation de protéine de maturation purifiée à 50%, obtiennent une reconstitution de particules infectieuses; ces dernières sont cependant sensibles à l'action de la RNase, ce qui suggère une réaction incomplète ou défectueuse.

Nous avons entrepris nos recherches dans le but d'étudier la fonction de la protéine de maturation dans la modulation de la traduction du génôme phagique : purification de la protéine et des produits résultant de son clivage, influence de la protéine et de ses fragments dans un système de synthèse de protéine 'in vitro' dirigé par l'ARN phagique, attachement à l'ARN phagique. Pour purifier la protéine de maturation, nous avons appliqué le principe de la méthode de Osborn et al. (86) qui nous a fourni une préparation plus pure que celle de Steitz (105). Notre étude est consacrée à la protéine de maturation du bactériophage R17, phage plus connu que $\mu 2$.

2.2 MATERIEL ET METHODES

2.2.1. Méthodes

Certaines méthodes sont celles que nous avons décrites pour le bactériophage $\mu 2$ dans la première partie du présent travail.

- Production en milieu liquide du bactériophage R17 (1.2.2.1.b)
- Purification du bactériophage R17 (1.2.2.2.)
- Détermination du titre en particules infectieuses (1.2.2.3.)

- Microscopie électronique (1.2.2.6.)
- Electrophorèse analytique sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (1.2.2.7.)
- Détermination du poids moléculaire de la protéine de maturation (1.2.2.11.)
- Extraction de la protéine capsidique (1.2.2.17.)
- Filtration sur gel de Séphadex (1.2.2.18.)

2.2.2. Electrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

Le principe de la méthode est celui de l'électrophorèse analytique en gel de polyacrylamide en présence de SDS, décrite sous 1.2.2.7. L'appareil utilisé (Stälprodukter, Uppsala, Suède) est schématisé dans la Figure 20. La chambre d'élution est remplie d'un gel support (Sépharose 4B), séparé du gel

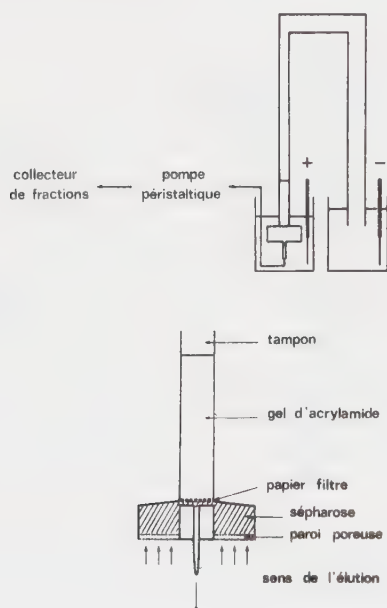


Fig. 20. Schéma de l'appareil pour l'électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide-SDS 10%.
Explications : voir texte.

d'acrylamide par un papier filtre. L'élution se fait dans le même axe que la migration des protéines pendant l'électrophorèse; aspiré du réservoir de l'anode, le tampon entraîne avec lui le matériel à sa sortie du gel. Le point délicat dans l'usage de l'appareil est en rapport avec la vitesse d'élution; si cette vitesse est trop élevée, le matériel sortant du gel est dilué par le tampon d'élution; si cette vitesse est trop faible, le matériel sortant du gel est refoulé dans la chambre d'élution, ce qui provoque le mélange des protéines séparées.

La mise en oeuvre de l'appareil se fait suivant la méthode décrite par le fabricant. Avant de déposer le matériel qui contient les protéines à séparer, on procède à une pré-électrophorèse : on fait migrer une solution de violet cristallisé (0,01% dans une solution de SDS 1%) dans le but d'éliminer les impuretés contenues dans le gel (persulfates). L'électrophorèse dure 15 h (50V, 10 mA). La pré-électrophorèse permet aussi de vérifier si l'élution se fait correctement.

Le mélange de protéines à séparer est dialysé 2 h contre du tampon réservoir dilué 1/10 (SDS 1%, mercaptoéthanol 5 μ l/ml), puis incubé 30 min à 45°C. On ajoute ensuite à cette solution du glycérol (75 μ l/ml). Le tout est appliqué sur la surface du gel de polyacrylamide.

2.2.3. Purification du chlorhydrate de guanidine (guanidium-HCl)

Le chlorhydrate de guanidine dont on dispose habituellement n'est pas très pur. Celui que nous possédons (Merck) exige un traitement pour atteindre le critère de pureté adopté : le spectre en UV d'une solution 6M doit présenter une augmentation progressive, de 350 à 230 nm. Nous avons recouru à la méthode de purification décrite dans 'Methods in Enzymology', vol.XI, p.732.

Le test de pureté exécuté à la fin du traitement confirme que le chlorhydrate de guanidine répond au critère mentionné ci-dessus.

2.2.4. Purification partielle de la protéine de maturation selon Steitz (105)

A 1 ml de tampon SSC contenant 200 à 300 mg de phage R17 purifié, on ajoute 3 ml de guanidium-HCl 8M dans du Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5. Après une incubation de 4h30 min à 46°C, le mélange est dialysé pendant 18 h, à température ambiante contre trois fois un litre de Tris-HCl 0,05 M, urée 8 M, pH 8,4. Le dialysat est ensuite appliqué sur une colonne de 1,5 cm x 8 cm de phosphocellulose (Whatman P 11) équilibrée au préalable avec une solution de Tris-HCl 0,1 M, urée 8 M, pH 8,4. L'ARN et la protéine capsidique sont élués par lavage de la colonne avec une solution de Tris-HCl 0,05 M, urée 8 M, NaCl 0,04 M, pH 8,4, à une vitesse de 10 ml/h, jusqu'à ce qu'il n'y ait plus, dans l'éluat, de matériel capable d'absorber à 280 nm. La protéine de maturation est alors élue à l'aide d'un gradient linéaire de 120 ml de Tris 0,05 M, urée 8 M, pH 8,7, NaCl 0,04-0,4 M, à la vitesse de 20 ml/h.

La Figure 21 montre l'élution de la protéine de maturation révélée par la mesure de la DO₂₈₀. Les fractions qui correspondent au pic sont conservées.

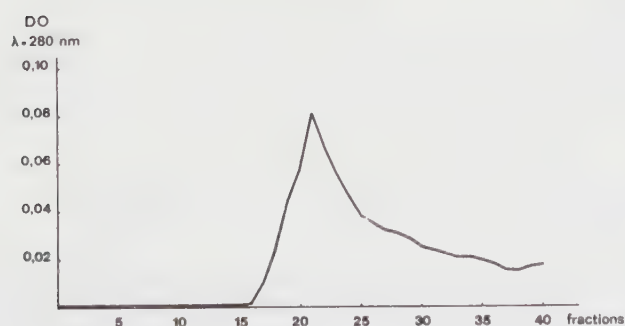


Fig. 21. Extraction de la protéine de maturation selon Steitz (105) : Elution de la colonne de phosphocellulose.

2.2.5. Purification de la protéine de maturation

La méthode adoptée est une modification de celle de Osborn et al. (86). Au cours de la purification, la protéine de maturation est repérée au moyen d'électrophorèse analytique sur gel de polyacrylamide-SDS. 1 volume de suspension phagique à 4 mg/ml dans du tampon SSC est rapidement ajouté à deux volumes d'acide acétique glacial au début de sa cristallisation, à 4°C. Le mélange est agité délicatement pendant 3 à 4 h à 4°C, puis centrifugé

20 min à 10.000 g. Le culot est lavé une fois, à 4°C, avec de l'acide acétique 66%; un nouveau lavage, destiné à l'enlèvement des restes d'acide, est exécuté, à température ambiante, avec de l'éthanol à 95°.

Le culot est redissout dans du tampon T (SDS 1%, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,03 M, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,07 M, pH 7, mercaptoéthanol 1%); la concentration finale en ARN phagique est inférieure à 10 mg/ml. Pendant la dissolution, le pH est constamment maintenu à 7,0 par l'adjonction goutte à goutte de NaOH 2 N.

Au culot complètement dissout, on ajoute du KCl 2 M pour réaliser une concentration finale de 0,1 M. Le précipité formé est dissout à 50°C, puis reformé à 4°C avec agitation. Le mélange est alors centrifugé 5 min à 4000 g et le culot conservé. Grâce à cette précipitation, les protéines sont pour la plupart entraînées dans le culot tandis que les acides nucléiques se trouvent dans le surnageant. La récupération des protéines qui restent dans le surnageant se fait par un deuxième traitement au KCl après adjonction d'une quantité de SDS suffisante pour obtenir à nouveau la concentration finale de 1%. Les culots de la première et de la seconde opération sont réunis, puis resuspendus dans du KCl 0,5 M. Le mélange est placé dans un sac à dialyse, et centrifugé pendant 20 min à 4000 g; le surnageant est éliminé, puis remplacé par du tampon T et dialysé trois fois contre 1 litre du même tampon à 37°C. Le dialysat est enfin soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% en présence de SDS.

2.2.6. Élimination du dodécylsulfate de sodium

Le principe de la méthode consiste à enlever le SDS lié à une protéine en le fixant sur un fort échangeur anionique tel que le Dowex. La méthode utilisée provient de celle de Weber et Kuter (121), avec quelques modifications.

a) Préparation de la résine

Le Dowex AG 1-X2 (Bio-Rad, 200-400 mesh) est lavé et équilibré successivement avec :

- NaOH 2 N
- Eau distillée
- Acide acétique 4 N
- Eau distillée
- Tampon Tris- CH_3COOH 0,05 M, pH 7,8

La résine est alors conservée à 4°C.

b) Formation de la colonne

Avant l'emploi, la résine est rééquilibrée avec du tampon U (Tris-acétate 0,05 M, pH 7,8, urée 6 M, mercaptoéthanol 0,01 M), parfois avec un autre tampon (2.3.5.). Avec le Dowex ainsi traité, on forme une colonne de 1,4 cm x 8 cm. La colonne est lavée et équilibrée avec le même tampon.

c) Traitement de l'échantillon

Pour garder la protéine soluble et pour faciliter l'enlèvement du SDS, on ajoute à l'échantillon suffisamment d'urée pour obtenir une concentration finale de 6 M. Pour maintenir le pouvoir réducteur du milieu, on assure une concentration 0,01 M de mercaptoéthanol. Le mélange est alors incubé 30 min, soit à température ambiante, soit à 37°C.

La suspension est maintenant appliquée sur la colonne de Dowex, puis éluée avec du tampon U, avec ou sans NaCl 0,9%, à la vitesse de 30 ml/h. L'éluat est analysé par un détecteur d'absorption à 280 nm. Dans le but d'éliminer le SDS avec plus de ménagements, nous avons parfois dialysé l'échantillon contre du tampon U contenant le Dowex traité.

d) Elimination de l'urée

La solution qui contient la protéine éluée est dialysée contre 100 ml de tampon U dans lequel est ajouté, au moyen d'une pompe péristaltique, le tampon de renaturation choisi (2.3.5.), à la vitesse de 100 ml/h jusqu'à l'obtention d'un volume total de 1000 ml. L'opération se fait à température ambiante. Cette première dialyse doit se faire très lentement car il convient d'éviter que la protéine ne précipite. La solution protéique est ensuite dialysée deux fois contre 1 litre du même tampon de renaturation, à 4°C.

2.2.7. Purification de l'ARN du phage R17

L'extraction de l'ARN est réalisée par la méthode au phénol décrite par Capecchi (16).

2.2.8. Contrôle de l'homogénéité de l'ARN du bactériophage R17

Pour ce contrôle, nous avons recouru au traitement par la formaldéhyde, selon la méthode de Boedtker (11). Ce réactif délie les liaisons hydrogènes de l'ARN et révèle d'éventuelles cassures que l'on peut identifier par sédimentation en gradient de saccharose.

Une solution de formaldéhyde à 35% est ramenée à 30% par l'adjonction (1/6ème de son volume) de tampon $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,45 M, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 M. On ajoute un volume de cette solution à 9 volumes d'une solution d'ARN en tampon CH_3COONa 0,001 M, pH 4,6 contenant 80 µg d'ARN. Le mélange est chauffé 15 min à 63°C, refroidi immédiatement dans la glace et appliqué sur un gradient linéaire de saccharose (2,3 ml d'une solution à 20% + 2,3 ml d'une solution à 5%). Ce gradient est préparé dans du tampon contenant HCHO 1,1 M, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M. Le mélange est centrifugé 5 h à 300.000 g; à la fin de la centrifugation, on perfore le fond du tube et on récolte les fractions dont on détermine la DO_{260} .

2.2.9. Reconstitution de particules infectieuses

Nous avons adopté ici soit la méthode de Roberts et Steitz (94), soit des modifications de cette méthode (cf 2.3.5.). Les constituants phagiques purifiés (protéine capsidique, protéine de maturation et ARN) sont mélangés à 0°C dans des proportions adéquates en présence de 5,7 M d'urée et dialysés trois fois à 4°C contre un tampon TSE (Tris-HCl 0,02 M, NaCl 0,15 M, EDTA 0,001 M, pH 9) additionné de mercaptoéthanol 1% et de MgCl_2 0,01 M.

La détermination de l'infectiosité se fait par la mesure du titre en particules infectieuses.

2.2.10. Attachement de la protéine capsidique à l'ARN

La protéine capsidique et l'ARN sont incubés dans les conditions décrites par Spahr et al. (98). Le mélange est ensuite appliqué sur un gradient de saccha-

rose 5-20% et centrifugé pendant 65 min à 300.000 g. Les fractions récoltées sont analysées en fonction de la DO_{260} .

2.2.11. Marquage de la protéine de maturation au $SDS-S^{35}$

La préparation du complexe protéine de maturation- $SDS-S^{35}$ est faite durant le processus d'extraction de la protéine de maturation. Au moment de dissoudre le culot provenant de l'extraction à l'acide acétique, on ajoute 10 μ l de $SDS-S^{35}$ (solution à 4%; activité spécifique : 66 mCi/g). On incube la suspension pendant 30 min à température ambiante, puis on amène la concentration finale de détergent à 1% par du SDS non marqué. Après dissolution du culot, l'activité totale de la suspension atteint $13,8 \times 10^6$ CPM. Après la précipitation au KCl et dialyse finale contre du SDS 1%, on dispose d'une préparation de protéine de maturation dont l'activité totale est de $3,7 \times 10^6$ CPM. Sur la protéine, on a donc pu fixer environ 27% du $SDS-S^{35}$ utilisé.

2.3 RESULTATS

2.3.1. Pureté du bactériophage R17

La pureté des préparations de bactériophage R17 a été contrôlée par :

- électrophorèse sur gels de polyacrylamide en présence de SDS
- microscopie électronique
- le rapport DO_{260}/DO_{280}

Le degré de pureté des préparations de bactériophage R17 est le même que celui obtenu avec μ 2 (1.3.1.).

2.3.2. Pureté de la protéine de maturation

La Figure 22 présente le profil d'une électrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide-SDS pour une préparation brute de protéine de maturation, préparation déjà débarrassée d'une partie de protéine capsidique et d'une partie de l'ARN par le traitement à l'acide acétique et par le traitement au SDS.

Le pic A correspond à l'élution de la protéine capsidique restante. Le pic B correspond à l'élution de la protéine de maturation purifiée.

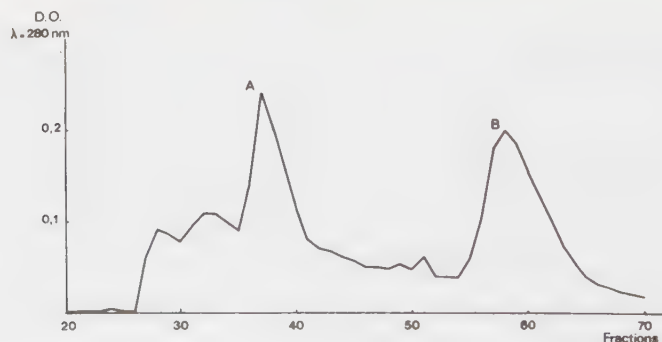


Fig. 22. Profil d'élution de l'électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide-SDS pour la purification de la protéine de maturation. Pic A : protéine capsidique; pic B : protéine de maturation.

La Figure 23 représente trois gels de polyacrylamide-SDS obtenus à partir :

- a) d'une suspension purifiée de R17
- b) d'un extrait brut de protéine de maturation obtenu par traitement à l'acide acétique
- c) d'une préparation purifiée de protéine de maturation (pic B de la Figure 22).

On retrouve sur les trois gels la bande qui correspond à la protéine de maturation. Sur le gel b, la proportion de protéine de maturation par rapport à la protéine capsidique est plus élevée que sur le gel a; quant au gel c, il ne montre plus de protéine capsidique.



Fig. 23. Electrophorèse en gel d'acrylamide-SDS 10% d'une suspension purifiée de R17 (a), d'un extrait brut de protéine de maturation obtenu par traitement à l'acide acétique (b) et d'une préparation purifiée de protéine de maturation (pic B de la Figure 22) (c).

A la sortie du gel, la concentration de la protéine de maturation, mesurée par la DO₂₈₀ (référence : albumine sérique de boeuf) est de 200 à 300 $\mu\text{g/ml}$; on récupère au total 1,5 mg de protéine, ce qui correspond à quelque 50% du matériel de départ. Cette protéine est liée au SDS, que nous devons éliminer avant d'entreprendre les tests biologiques.

2.3.3. Élimination du dodécylsulfate de sodium de la protéine de maturation

La Figure 24 présente une courbe obtenue par élution de la colonne de résine Dowex après application de la protéine de maturation en solution de SDS. Les fractions qui correspondent au pic sont conservées pour les tests biologiques.

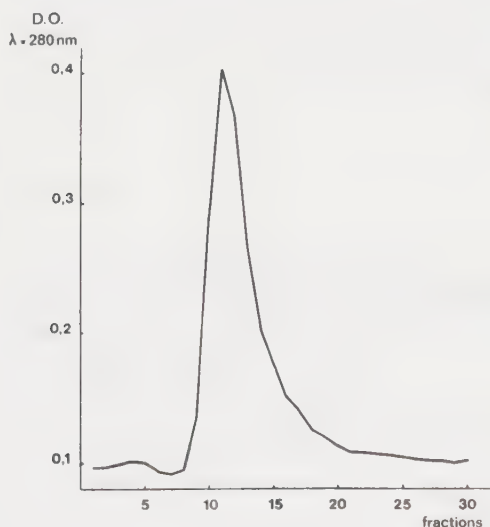


Fig. 24. Élimination du SDS de la protéine de maturation : élution de la colonne de Dowex.

La Figure 25 se rapporte à un gel de polyacrylamide-SDS obtenu après électrophorèse d'une fraction du pic d'élution de la colonne de Dowex. Ce gel est comparé à un gel provenant d'une suspension de R17 purifié. Les bandes qui correspondent à la protéine de maturation s'y retrouvent; elles ont une mobilité semblable.

2.3.4. Élimination du SDS-S³⁵ de la protéine de maturation

Pour contrôler cette élimination, nous avons marqué la protéine au SDS-S³⁵. 2 ml d'une préparation de protéine de maturation-SDS-S³⁵ en urée 6 M, avec une activité totale de $1,5 \times 10^6$ CPM, sont appliqués sur une colonne de Dowex, puis élués avec du tampon Tris-acétate 0,05 M, pH 7,8, urée 6 M, mercapto-éthanol 0,01 M, NaCl 0,9%, à la vitesse de 30 ml/h. Les résultats sont portés sur la Figure 26, où l'on a déterminé la DO₂₈₀ et la radioactivité de chaque fraction.

Il n'y a pas de SDS-S³⁵ décelable au niveau du pic. L'analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS d'une fraction du pic confirme la présence de la protéine de maturation.



Fig. 25. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS 10% de l'éluat de la colonne de Dowex (a) comparée à celle d'une suspension de R17 purifiée (b).

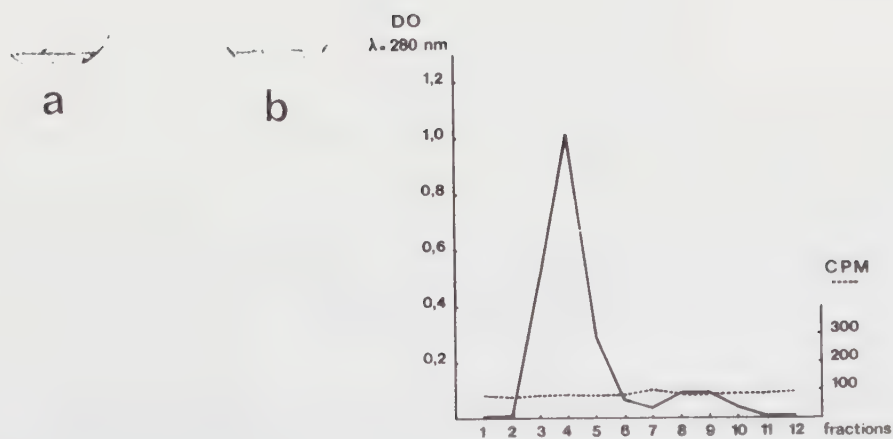


Fig. 26. Elimination du SDS-S³⁵ de la protéine de maturation. Explications : voir texte.

2.3.5. Elimination de l'urée

Les différents tampons utilisés dans ce but sont :

- Tris-acétate 0,05 M, pH 7,8, mercaptoéthanol 0,001 M, EDTA 0,1 mM
- Tris-acétate 0,05 M, pH 7,8, EDTA 0,1 mM
- Tris-acétate 0,05 M, pH 7,8, mercaptoéthanol 0,001 M
- TSE pH 9, EDTA 0,1 mM, mercaptoéthanol 0,001 M
- TSE pH 9, EDTA 0,1 mM, mercaptoéthanol 0,001 M, $MgCl_2$ 0,01 M
- TSE pH 9, EDTA 0,1 mM, mercaptoéthanol 0,1 M
- SSC pH 7, mercaptoéthanol 0,01 M
- SSC pH 7

A chaque essai, il se forme cependant un précipité qui reste insoluble (quantité de protéine au départ : environ 500 μg). Après centrifugation, la concentration en protéine du surnageant, déterminée par la méthode de Lowry, est de 60-70 $\mu g/ml$.

Lorsque le précipité est remis en suspension dans un tampon, il se produit une nouvelle dissolution (60-70 $\mu g/ml$), ce qui pourrait s'expliquer probablement par une faible constante de solubilité de la protéine.

2.3.6. Poids moléculaire de la protéine de maturation

Sa détermination est faite par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% en présence de SDS. Les préparations de référence sont :

Fumarase	PM : 49.000
Ovalbumine	PM : 43.000
Alcool deshydrogénase	PM : 37.000
β -lactoglobuline	PM : 18.400

La détermination a été faite sur deux séries de 12 gels.

Sur chaque gel, on dépose 100 μl du mélange suivant :

- 3 volumes de fumarase à 500 $\mu g/ml$
- 1 volume d'ovalbumine à 2 mg/ml
- 1 volume d'ADH à 2 mg/ml
- 1 volume de β -lactoglobuline à 2 mg/ml
- 8 volumes d'une préparation de protéine de maturation à 250 $\mu g/ml$
- 2 volumes de mercaptoéthanol.

Dans la Figure 27, le logarithme des poids moléculaires est exprimé en fonction de la mobilité. La détermination graphique du poids moléculaire de la protéine de maturation du bactériophage R17 donne le chiffre de 40.800.

Les mêmes données, traitées par l'ordinateur CDC 3800 de l'Université de Genève, aboutissent à une valeur de 40.400.

2.3.7. Reconstitution du pouvoir infectieux du bactériophage R17

Tester l'activité biologique de la protéine de maturation purifiée, c'est tout d'abord reconstituer le pouvoir infectieux à partir des sous-unités du bactériophage R17 : protéine capsidique, protéine de maturation et ARN. Avant de procéder à de tels essais, nous avons vérifié les propriétés de la protéine capsidique et de l'ARN.

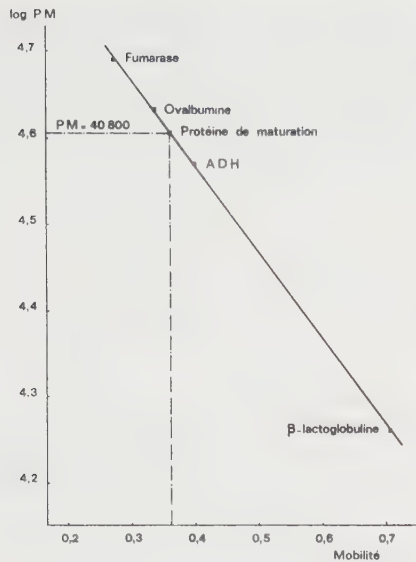


Fig. 27. Détermination du poids moléculaire de la protéine de maturation du phage R17 par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS 10%.

a) Contrôle physique de l'ARN

Le traitement de l'ARN par la formaldéhyde à chaud a pour but de révéler, par une centrifugation en gradient de saccharose, les fragments résultant d'éventuelles cassures. Dans la Figure 28, la courbe se rapporte aux mesures de DO₂₆₀ faites avec les fractions récoltées après centrifugation. On note que la préparation d'ARN est homogène et que, probablement, la plupart des molécules sont restées entières pendant l'extraction.

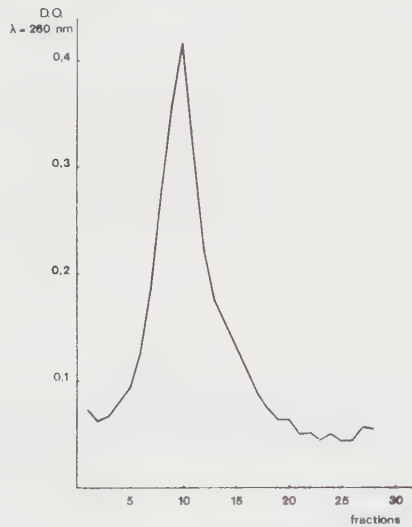


Fig. 28. Sédimentation de l'ARN formolé selon la technique de Boedtker (11).

b) Contrôle de l'activité biologique de l'ARN et de la protéine capsidique

Cet essai a pour but de contrôler si l'ARN et la protéine capsidique du phage R17 ont conservé leur propriété de liaison et, plus précisément, l'aptitude de former le complexe II décrit par Spahr et al. (98). Le mélange de constituants (ARN/protéine capsidique = 1/60) est incubé dans du tampon TMK (acétate de Mg 0,01 M, Tris 0,01 M, pH 7,5, KCl 0,08 M), puis analysé par un gradient de saccharose 5-20%. La Figure 29 exprime les résultats obtenus. La courbe, construite selon la DO₂₆₀ des fractions récoltées du gradient,

montre un premier pic (pic A) qui, par sa position, correspond au complexe II décrit par Spahr et al. (98); le deuxième pic (pic B), se rapporte à l'ARN non lié ou lié à quelques molécules de protéine capsidique. Les deux flèches de la même Figure indiquent la position de l'ARN et du phage R17 dans un gradient de saccharose centrifugé en parallèle et dans les mêmes conditions.

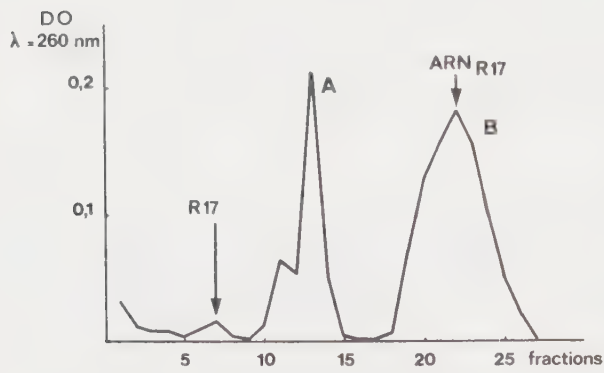


Fig. 29. Liaison de la protéine capsidique à l'ARN phagique. A : complexe II (98); B : ARN (+ éventuellement quelques molécules de protéine capsidique liées). Les flèches indiquent les positions du phage R17 et de l'ARN sur un gradient centrifugé en parallèle.

c) Reconstitution du pouvoir infectieux du bactériophage R17

Après vérification de l'activité biologique de l'ARN et de la protéine capsidique, nous pouvons maintenant tester l'activité de la préparation de protéine de maturation. L'expérience fut répétée plusieurs fois, après variation de plusieurs paramètres : pH, force ionique, sels, température d'incubation, molarité du mercaptoéthanol. A cet effet, nous avons utilisé différentes préparations de protéine de maturation sans jamais obtenir de résultat significativement positif. Dans les cas les plus favorables, nous avons obtenu un nombre de p.i. 50 à 100 fois plus élevé que pour les témoins.

Le Tableau VII illustre une de ces expériences ; nous avons travaillé dans les mêmes conditions expérimentales que celles décrites par Roberts et Steitz (94), mais en utilisant notre préparation de protéine de maturation : 80 µg de protéine capsidique, 50 µg d'ARN et 5 µg de protéine de maturation sont mélangés à 0°C en solution d'urée 5,7 M; le mélange est dialysé contre du tampon TSE pH 9, MgCl₂ 0,01 M, mercaptoéthanol 1%.

Tableau VII

Reconstitution de particules infectieuses : les conditions expérimentales sont décrites dans le texte; l'infectiosité est déterminée par le titre des p.i. /ml

ARN	Protéine de maturation	Protéine capsidique	p.i. /ml
+			3 · 10 ³
	+		5 · 10 ²
+		+	10 ⁴
+	+	+	5 · 10 ⁵

Dans l'exemple choisi ci-dessus, l'augmentation est de 50 fois par rapport au témoin le plus élevé (protéine capsidique + ARN). Nous estimons que ce résultat ne semble pas significatif; pour être sûr d'un résultat positif, nous devrions observer un titre en particules infectieuses de 100 à 1000 fois supérieur; on n'oubliera pas en effet, qu'on utilise 100 à 300 mg de phage au départ, ce qui représente 10^{15} – 10^{16} p.i. /ml.

Ces résultats suggèrent deux hypothèses :

- a) la protéine de maturation n'est pas biologiquement active
- b) l'expérience de reconstitution souffre d'un défaut (manipulation technique, qualité des réactifs).

Pour contrôler cette dernière hypothèse, nous avons répété l'expérience de Roberts et Steitz (94) depuis le début, en utilisant une préparation de protéine de maturation extraite selon la méthode décrite par le même auteur (105).

2.3.8. Reconstitution du pouvoir infectieux selon Roberts et Steitz (94)

Le Tableau VIII résume nos observations lorsque nous répétons intégralement l'extraction de la protéine de maturation et la méthode de reconstitution de Roberts et Steitz (94).

Tableau VIII

Reconstitution du pouvoir infectieux selon Roberts et Steitz (94).

L'infectiosité est déterminée par le titre des p.i. /ml

ARN	Protéine capsidique	Protéine de maturation	p.i. /ml
+			$< 10^2$
	+		$3 \cdot 10^2$
		+	$2 \cdot 10^2$
+		+	$2 \cdot 10^5$
+	+		$7,5 \cdot 10^4$
+	+	+	$1,1 \cdot 10^8$

Nous obtenons une augmentation du titre en p.i. qui se trouve en accord avec les résultats obtenus par Roberts et Steitz et qui sont reproduits dans le Tableau IX.

Tableau IX

Reconstitution de particules infectieuses :
résultats obtenus par Roberts et Steitz (94)

ARN	Protéine de maturation	Protéine capsidique	p.i. /ml
+		+	$1,2 \cdot 10^5$
+	+		$9 \cdot 10^3$
+	+	+	$2,7 \cdot 10^7$

Nous devons donc admettre que notre préparation de protéine de maturation n'est pas biologiquement active.

2.4 DISCUSSION

Les expériences décrites dans cette partie de notre travail ont permis de purifier d'une façon satisfaisante la protéine de maturation du bactériophage R17. Toutefois, la protéine isolée s'est montrée privée d'activité biologique lorsque nous avons tenté de reconstituer le pouvoir infectieux. L'échec ne provient vraisemblablement pas d'un défaut de manipulation au cours des différentes étapes de la reconstitution, ni d'une perte d'activité de l'acide ribonucléique ou de la protéine capsidique. Par ailleurs, nous avons pu établir clairement qu'il ne restait plus de SDS détectable sur la protéine de maturation traitée par la résine Dowex. Deux hypothèses peuvent expliquer ces résultats négatifs :

- a) la protéine de maturation subit des modifications irréversibles pendant l'extraction
- b) il manque un facteur inconnu, issu probablement de la cellule hôte.

2.4.1 Modifications irréversibles de la protéine de maturation

Nous avons observé que le précipité obtenu lors des essais de renaturation de la protéine à partir de la solution d'urée se redissolvait partiellement et que la mobilité électrophorétique de cette même protéine sur gel de polyacrylamide-SDS demeurerait toujours identique; ces faits ne sont pas des arguments suffisants pour que nous puissions conclure à l'état natif de la protéine de maturation; il suffit en effet d'une dégradation partielle ou d'une altération de quelques acides aminés pour que la molécule soit privée de son activité biologique, bien qu'offrant une mobilité électrophorétique semblable à celle de la protéine native.

2.4.2. Facteurs nécessaires à la reconstitution

Cette hypothèse n'est pas improbable 'a priori'. Nous savons que la synthétase du bactériophage Q β agit en association avec des facteurs cellulaires (37,10). Par ailleurs, Passent et Kaesberg ont montré qu'en présence de rifampine, antibiotique qui inhibe spécifiquement l'ARN-polymérase cellulaire, le nombre des particules phagiques formées était bas, bien que la synthèse, soit de l'ARN, soit des protéines capsidique et de maturation, paraisse presque normale (91). Les expériences de Engelberg et Soudry avec le phage MS2 confirment ces faits, tout en précisant que ce phénomène n'a lieu que si on ajoute l'antibiotique pendant les premières 15 min du cycle infectieux (24,25).

Ces observations suggèrent que la présence d'un facteur cellulaire serait indispensable à l'assemblage des protéines et de l'ARN phagiques pour constituer la particule infectieuse. On peut admettre que l'expérience de Roberts et Steitz (94) est significative, mais l'on ne manquera pas de relever que la préparation de protéine de maturation utilisée par ces auteurs présentait une pureté qui ne dépassait pas 50%.

2.5 CONCLUSION

Au début de la deuxième partie de ce travail (2.1.), nous nous étions proposé d'étudier les fonctions de la protéine de maturation dans la modulation de la traduction du génôme phagique, ceci à partir d'une préparation purifiée de cette protéine. Une condition préalable à cette étude était d'obtenir une préparation de protéine de maturation biologiquement active pour limiter, dans la mesure du possible, de fausses interprétations de résultats pouvant provenir d'artefacts.

Au vu des résultats obtenus, nous renonçons à poursuivre plus loin les expériences envisagées, d'autant plus que des essais préliminaires, où nous avons tenté de lier la protéine de maturation à l'ARN et de moduler, par cette protéine, la traduction du génôme phagique 'in vitro', n'ont pas donné de résultats positifs.

Nous avons montré que l'approche envisagée dans ce travail pour l'étude de la protéine de maturation du bactériophage R17 n'était pas concluante. A notre avis, le problème doit être revu dans son ensemble. Il conviendra de mettre au point, pour l'isolement et la purification de cette protéine, des méthodes aussi efficaces mais plus douces que celles adoptées ici.

BIBLIOGRAPHIE

1. ADAMS, J.H. : Bacteriophages, p. 450-451 (Interscience Publ., New York 1959).
2. ADAMS, J.M. and CORY, S. : Untranslated nucleotide sequence at the 5'-end of R17 bacteriophage RNA. *Nature, Lond.* 227: 570-574 (1970).
3. ADAMS, J.M., JEPPESEN, P.G.N., SANGER, F. and BARREL, B.G. : A nucleotide sequence from the coat protein cistron of R17 bacteriophage RNA. *Nature, Lond.* 223: 1009-1014 (1969).
4. ADAMS, J.M., SPAHR, P.F. and CORY, S. : Nucleotide sequence from the 5'-end to the first cistron of R17 bacteriophage ribonucleic acid. *Biochemistry* 11: 976-988 (1972).
5. AHMAD-ZADEH, C., FIGUET, J.D. and COLLI, L. : Molecular weight estimation of immunoglobulin subunits on polyacrylamide gel. *Immunology* 21: 1065-1071 (1971).
6. ARGETSINGER, J.E. and GUSSIN, G.N. : Intact ribonucleic acid from defective particles of bacteriophage R17. *J. molec. Biol.* 21: 421-434 (1966).
7. BERNARDI, A. and SPAHR, P.F. : Nucleotide sequence at the binding site on R17 RNA for coat protein. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 69: 3033-3037 (1972).
8. BILLETER, M.A., DAHLBERG, I.E., GOODMAN, H.M., HINDLEY, J. and WEISSMANN, C. : Sequence of the first 175 nucleotides from the 5'-terminus of Q β RNA synthesized 'in vitro'. *Nature, Lond.* 224: 1083-1086 (1969).
9. BISHOP, D.H.L., CLAYBROOK, J.R. and SPIEGELMAN, S. : Electrophoretic separation of viral nucleic acids on polyacrylamide gels. *J. molec. Biol.* 26: 373-387 (1967).
10. BLUMENTHAL, T., LANDERS, T.A. and WEBER, K. : Bacteriophage Q β replicase contains the protein biosynthesis elongation factors EF Tu and EF Ts. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 69: 1313-1317 (1972).
11. BOEDTKER, H. : The reaction of ribonucleic acid with formaldehyde. I.- Optical absorbance studies. *Biochemistry* 6: 2718-2727 (1967).
12. BOEDTKER, H. : Dependence of the sedimentation coefficient on molecular weight of RNA after reaction with formaldehyde. *J. molec. Biol.* 35: 61-70 (1968).
13. BOEDTKER, H. : Conformation-independent molecular weight determinations of RNA by gel electrophoresis. *Biochim. biophys. Acta* 240: 448-453 (1971).
14. BRINTON, C. C., GEMSKI, J. R. and CARNAHAN, J. : A new type of bacterial pilus genetically controlled by the fertility factor of *E. coli* K12 and its role in chromosome transfer. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 52: 776-783 (1964).
15. CASPAR, D. L. D. and KLUG, A. : Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* 27: 1-24 (1962).
16. CAPECCHI, M. R. : Cell-free protein synthesis programmed with R17 RNA : identification of two phage proteins. *J. molec. Biol.* 21: 173-193 (1966).
17. CAPECCHI, M. R. : Polarity 'in vitro'. *J. molec. Biol.* 30: 213-217 (1967).
18. CEPPELLINI, M., DETTORI, R. and POOLE, F. : Sex specific bacteriophages of *E. coli* K12. III.- Physico-chemical characterization of phage μ 2. *Giorn. Microbiol.* 11: 9-13 (1963).
19. CLOWES, R. C. and HAYES, W. : Experiments in microbial genetics, p. 232-233 (Blackwell, Oxford 1968).
20. CORY, S., ADAMS, J. M., SPAHR, P. F. and RENSING, U. : Sequence of 51 nucleotides at the 3'-end of R17 bacteriophage RNA. *J. molec. Biol.* 63: 41-56 (1972).
21. CORY, S., SPAHR, P. F. and ADAMS, J. M. : Untranslated nucleotide sequences in R17 bacteriophage RNA. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* 35: 1-12 (1970).
22. DETTORI, R., MACCACARO, G. A. and PICCININ, G. L. : Sex specific bacteriophages of *E. coli* K12. *Giorn. Microbiol.* 9: 141-150 (1961).
23. DETTORI, R., MACCACARO, G. A. and TURRI, M. : Sex specific bacteriophages of *E. coli* K12 IV.- Host specificity, pattern of lysis and lethality of phage μ 2. *Giorn. Microbiol.* 11: 15-34 (1963).
24. ENGELBERG, H. and SOUDRY, E. : Inhibition of ribonucleic acid bacteriophage release from its host by rifampin. *J. Virol.* 7: 847-848 (1971).

25. ENGELBERG, H. and SOUDRY, E.: Ribonucleic acid bacteriophage release : requirement for host-controlled protein synthesis. *J. Virol.* 8: 257-264 (1971).
26. ENGER, M. D. and KAESBERG, P.: Comparative studies of the coat proteins of R17 and M12 bacteriophages. *J. molec. Biol.* 13: 260-268 (1965).
27. ENGER, M. D., STUBBS, E. A., MITRA, S. and KAESBERG, P.: Biophysical characteristics of the RNA-containing bacterial virus R17. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 49: 857-860 (1963).
28. FISKE, C. H. and SUBBA ROW, Y.: The colorimetric determination of phosphour. *J. biol. Chem.* 66: 375-400 (1925).
29. FRANCKE, B. and HOFSCHNEIDER, P. H.: Über infektiöse Substrukturen aus *E. coli* Bakteriophagen. VII.- Formation of a biologically intact replicative form in ribonucleic acid bacteriophage (M12) infected cells. *J. molec. Biol.* 16: 544-552 (1966).
30. FRANCKE, B. and HOFSCHNEIDER, P. H.: Infectious nucleic acids of *E. coli* bacteriophages. XI.- Differentiation between conservatively and semiconservatively replicating RNA intermediates of the bacteriophage M12 by formaldehyde inactivation. *J. molec. Biol.* 40: 45-63 (1969).
31. FRANCKE, B. and HOFSCHNEIDER, P. H.: Infectious nucleic acids of *E. coli* bacteriophages. IX.- Sedimentation constants and strand integrity of infectious M12 phage replicative-form RNA. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 56: 1883-1890 (1966).
32. GESTELAND, R. F. and BOEDTKER, H.: Some physical properties of bacteriophage R17 and its ribonucleic acid. *J. molec. Biol.* 8: 496-507 (1964).
33. GESTELAND, R. F. and SPAHR, P. F.: Translation of R17 RNA fragments. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* 34: 707-716 (1969).
34. CORNALL, A. G., BARDAWILL, C. S. and DAVID, M. M.: Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. biol. Chem.* 177: 751-766 (1949).
35. GRANBOULAN, N. and FRANKLIN, R. M.: Electron microscopy of viral RNA, replicative form and replicative intermediate of the bacteriophage R17. *J. molec. Biol.* 22: 173-177 (1966).
36. GRANBOULAN, N. and FRANKLIN, R. M.: Replication of bacteriophage ribonucleic acid : analysis of the ultrastructure of the replicative form and the replicative intermediate of bacteriophage R17. *J. Virol.* 2: 129-148 (1968).
37. GRONER, Y., SCHEPS, R., KAMEN, R., KOLAKOFSKY, D. and REVEL, M.: Host subunit of Q β replicase is translation control factor i. *Nature - New Biol., Lond.* 239: 19-20 (1972).
38. GUSSIN, G. N.: Three complementation groups in bacteriophage R17. *J. molec. Biol.* 21: 435-453 (1966).
39. HAMILTON, P. B. and ANDERSON, R. A.: Ion exchange chromatography of amino acids. Semi-automatic method of operation with cationic exchange resin columns. *Analyt. Chem.* 31: 1504-1512 (1959).
40. HAMPARIAN, V. V., MÜLLER, F. and HUMMELER, K.: Elimination of non-specific components from viral antigens by fluorocarbon. *J. Immunol.* 80: 468-475 (1958).
41. HINDLEY, J., STAPLES, D. H., BILLETER, M. A. and WEISSMANN, C.: Location of the coat cistron on the RNA of phage Q β . *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 67: 1180-1187 (1970).
42. HEISENBERG, M.: Formation of defective bacteriophage particles by fr "amber" mutants. *J. molec. Biol.* 17: 136-144 (1966).
43. HOHN, T.: Selfassembly of defective particles of the bacteriophage fr. *Europ. J. Biochem.* 2: 152-155 (1967).
44. HOHN, T. and HOHN, B.: Structure and assembly of simple RNA bacteriophages. *Adv. Virus Res.* 16: 43-99 (1970).
45. HORIUCHI, K., LODISH, H. F. and ZINDER, N. D.: Mutants of the bacteriophage f2. VI.- Homology of temperature-sensitive and host-dependent mutants. *Virology* 28: 438-447 (1966).
46. HORIUCHI, K. and MATSUHASHI, S.: Three cistrons in bacteriophage Q β . *Virology* 42: 49-60 (1970).
47. HORIUCHI, K., WEBSTER, R. E. and MATSUHASHI, S.: Gene products of bacteriophage Q β . *Virology* 45: 429-439 (1971).
48. HUNG, P. P. and OVERBY, L. R.: The reconstitution of infective bacteriophage Q β . *Biochemistry* 8: 820-828 (1969).

49. JEPPESEN, P. G. N., NICHOLS, J. L., SANGER, F. and BARRELL, B. G.: Nucleotide sequences from bacteriophage R17 RNA. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* 35: 13-19 (1970).
50. JEPPESEN, P. G. N., STEITZ, J. A., GESTELAND, R. F. and SPAHR, P. F.: Gene order in the bacteriophage R17 RNA : 5'-A protein-coat protein-synthetase-3'. *Nature, Lond.* 226: 230-237 (1970).
51. KAMEN, R.: Characterization of the subunits of Q β replicase. *Nature, Lond.* 228: 527-533 (1970).
52. KOLAKOFSKY, D. and WEISSMANN, C.: Possible mechanism for transition of viral RNA from polysome to replication complex. *Nature - New Biol., Lond.* 231: 42-46 (1971).
53. KOLAKOFSKY, D. and WEISSMANN, C.: Q β replicase as repressor of Q β -RNA directed protein synthesis. *Biochim. biophys. Acta* 246: 596-599 (1971).
54. KONDO, M. R., GALLERANI, R. and WEISSMANN, C.: Subunit structure of Q β replicase. *Nature, Lond.* 228: 525-527 (1970).
55. KONIGSBERG, W., MAITER, T., KATZE, J. and WEBER, K.: Amino-acid sequence of the Q β coat protein. *Nature, Lond.* 227: 271-273 (1970).
56. KONINGS, R. N. H., WARD, R., FRANCKE, B. and HOFSCHNEIDER, P. H.: Gene order of RNA bacteriophage M12. *Nature, Lond.* 226: 604-607 (1970).
57. KOZAK, M. and NATHANS, D.: Fate of maturation protein during infection by coliphage MS2. *Nature - New Biol., Lond.* 234: 209-211 (1971).
58. KRAHN, P. M., O'CALLAGHAN, R. J. and PARANCHYCH, W.: Stages in phage R17 infection. VI.- Injection of A protein and RNA into the host cell. *Virology* 47: 628-637 (1972).
59. KRAHN, P. M. and PARANCHYCH, W.: Heterogeneous distribution of A protein in R17 phage preparations. *Virology* 43: 533-535 (1971).
60. LIN, J.-W., TSUNG, C. M. and FRAENKEL-CONRAT, H.: The coat protein of the RNA bacteriophage MS2. *J. molec. Biol.* 24: 1-14 (1967).
61. LIU, T.-Y. and CHANG, Y. H.: Hydrolysis of proteins with p-toluene sulfonic acid. *J. biol. Chem.* 246: 2842-2848 (1971).
62. LODISH, H. F.: Independent translation of the genes of bacteriophage f2 RNA. *J. molec. Biol.* 32: 681-685 (1968).
63. LODISH, H. F.: Bacteriophage f2 RNA : control of translation and gene order. *Nature, Lond.* 220: 345-347 (1968).
64. LODISH, H. F.: Specificity in bacterial protein synthesis : role of initiation factors and ribosomal subunits. *Nature, Lond.* 226: 705-707 (1970).
65. LODISH, H. F., COOPER, S. and ZINDER, N. D.: Host dependent mutants of the bacteriophage f2. IV.- On the biosynthesis of a viral RNA polymerase. *Virology* 24: 60-70 (1964).
66. LODISH, H. F., HORIUCHI, K. and ZINDER, N. D.: Mutants of the bacteriophage f2. V.- On the production of non-infectious phage particles. *Virology* 27: 139-155 (1965).
67. LODISH, H. F. and ROBERTSON, H. D.: Regulation of 'in vitro' translation of bacteriophage f2 RNA. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* 34: 655-673 (1969).
68. LODISH, H. F. and ZINDER, N. D.: Mutants of bacteriophage f2. VIII.- Control mechanisms for phage-specific synthesis. *J. molec. Biol.* 19: 333-348 (1966).
69. LOEB, T.: Isolation of a bacteriophage specific for the F⁺ and Hfr mating types of *E. coli* K12. *Science* 131: 932-933 (1960).
70. LOEB, T. and ZINDER, N. D.: A bacteriophage containing RNA. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 47: 282-289 (1961).
71. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* 193: 265-275 (1951).
72. MARVIN, D. A. and HOFFMANN-BERLING, H.: Physical and chemical properties of two new small bacteriophages. *Nature, Lond.* 197: 517-518 (1963).
73. MEJBAUM, W.: Über die Bestimmung kleiner Pentosemengen, insbesondere in Derivaten der Adenylsäure. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 258: 117-120 (1939).
74. MIN JOU, W., HAEGEMAN, G. and FIERS, W.: Studies on the bacteriophage MS2. Nucleotide fragments from the coat protein cistron. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* 13: 105-109 (1971).

75. MIN JOU, W., HAEGEMAN, G., YSEBAERT, M. and FIER, S. W.: Nucleotide sequence of the gene coding for the bacteriophage MS2 coat protein. *Nature, Lond.* 237: 82-88 (1972).
76. MITRA, S., ENGER, M. D. and KAESBERG, P.: Physical and chemical properties of RNA from the bacterial virus R17. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 50: 68-75 (1963).
77. MOLECULAR BASIS OF VIROLOGY. Chapter I. Ed. by H. Fraenkel-Conrat. (Reinhold Book Company, London 1968).
78. MOORE, S.: Amino acid analysis: aqueous dimethyl sulfoxide as solvent for the ninhydrin reaction. *J. biol. Chem.* 243: 6281-6283 (1968).
79. MUELLER, J. M., PIERCE, J. G., DAVOLL, H. and DU VIGNAUD, V.: The oxydation of oxytocin with performic acid. *J. biol. Chem.* 191: 309-313 (1951).
80. NATHANS, D., OESCHGER, M. P., POLMAR, S. K. and EGGEN, K.: Regulation of protein synthesis directed by coliphage MS2 RNA. I.- Phage protein and RNA synthesis in cells infected with suppressible mutants. *J. molec. Biol.* 39: 279-292 (1969).
81. NEURATH, A. R., WIKTOR, T. J. and KOPROWSKI, H.: Density gradient centrifugation studies on rabies virus. *J. Bact.* 92: 102-106 (1966).
82. NICHOLS, J. L.: Nucleotide sequence from the polypeptide chain termination region of the coat protein cistron in bacteriophage R17 RNA. *Nature, Lond.* 225: 147-151 (1970).
83. NICHOLS, J. L. and ROBERTSON, H. D.: Sequences of RNA fragments from the bacteriophage f2 coat protein cistron which differ from their R17 counterparts. *Biochim. biophys. Acta* 228: 676-681 (1971).
84. NISHIHARA, T. and WATANABE, I.: Discrete buoyant density distribution among RNA phages. *Virology* 39: 360-362 (1969).
85. OESCHGER, M. P. and NATHANS, D.: Differential synthesis of bacteriophage-specific proteins in MS2-infected *E. coli* treated with actinomycin. *J. molec. Biol.* 22: 235-247 (1966).
86. OSBORN, M. A., WEINER, M. and WEBER, K.: Large scale purification of A protein from bacteriophage R17. *Europ. J. Biochem.* 17: 63-67 (1970).
87. OUCHTERLONY, O.: Diffusion-in-gel method for immunological analysis. II. *Progr. Allergy* 6: 30-154 (1962).
88. OVERBY, L. R., BARLOW, G. H., DOI, R. H., JACOB, M. and SPIEGELMAN, S.: Comparison of two serologically distinct ribonucleic acid bacteriophages. I.- Properties of the viral particles. *J. Bact.* 91: 442-448 (1966).
89. PARANCHYCH, W.: Stages in phage R17 infection: the role of divalent cations. *Virology* 28: 90-99 (1966).
90. PARANCHYCH, W. and GRAHAM, F.: Isolation and properties of an RNA-containing bacteriophage. *J. cell. comp. Physiol.* 60: 199-208 (1962).
91. PASSENT, J. and KAESBERG, P.: Effect of rifampin on the development of ribonucleic acid bacteriophage Q β . *J. Virol.* 8: 286-292 (1971).
92. PICKELS, E. G.: Sedimentation in the angle centrifuge. *J. gen. Physiol.* 26: 341-363 (1943).
93. RHIM, J. S., SHELL, K., CREASY, B. and CASE, W.: Biological characteristics and viral susceptibility of an African Green Monkey Kidney cell line (Vero). *Proc. Soc. exp. Biol., N. Y.* 132: 670-678 (1969).
94. ROBERTS, J. W. and STEITZ, J. F. A.: The reconstitution of infective bacteriophage R17. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 58: 1416-1421 (1967).
95. SCHEIDEGGER, J. J.: Une microméthode de l'immunoélectrophorèse. *Int. Arch. Allergy* 7: 103-110 (1955).
96. SCOTT, D. W.: Serological cross reactions among the RNA-containing coliphages. *Virology* 26: 85-88 (1965).
97. SHAPIRO, A. L., VINUELA, E. and MAIZEL, J. V.: Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 28: 815-820 (1967).
98. SPAHR, P. F., FARBER, M. and GESTELAND, R. F.: Binding site on R17 RNA for coat protein. *Nature, Lond.* 222: 455-458 (1969).
99. SPAHR, P. F. and GESTELAND, R. F.: Specific cleavage of bacteriophage R17 RNA by an endonuclease isolated from *E. coli* MRE-600. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 59: 876-883 (1968).

100. STAPLES, D.H. and HINDLEY, J.: Ribosome binding site of ϕ RNA polymerase cistron. *Nature - New Biol.*, Lond. 234: 211-212 (1971).
101. STAPLES, D.H., HINDLEY, J., BILLETER, M.A. and WEISSMANN, C.: Localization of ϕ maturation cistron ribosome binding site. *Nature - New Biol.*, Lond. 234: 202-204 (1971).
102. STAVIS, R.L. and AUGUST, J.T.: The biochemistry of RNA bacteriophage replication. *Annu. Rev. Biochem.* 39: 527-560 (1970).
103. STEIN, W.H. and MOORE, S.: The free amino acids of human blood plasma. *J. biol. Chem.* 211: 915-919 (1954).
104. STEITZ, J.A.: Identification of the A protein as a structural component of bacteriophage R17. *J. molec. Biol.* 33: 923-936 (1968).
105. STEITZ, J.A.: Isolation of the A protein from bacteriophage R17. *J. molec. Biol.* 33: 937-945 (1968).
106. STEITZ, J.A.: A slowly sedimenting, infective form of bacteriophage R17. *J. molec. Biol.* 33: 947-951 (1968).
107. STEITZ, J.A.: Polypeptide chain initiation: nucleotide sequences of the three ribosomal binding sites in bacteriophage R17 RNA. *Nature*, Lond. 224: 957-964 (1969).
108. STEITZ, J.A.: Oligonucleotide sequence of replicase initiation site in ϕ RNA. *Nature - New Biol.*, Lond. 236: 71-75 (1972).
109. STRAUSS, J.H. and SINSHEIMER, R.L.: Purification and properties of bacteriophage MS2 and of its ribonucleic acid. *J. molec. Biol.* 7: 43-54 (1963).
110. SUGIYAMA, T., HEBERT, R.R. and HARTMAN, K.A.: Ribonucleoprotein complexes formed between bacteriophage MS2 RNA and MS2 protein 'in vitro'. *J. molec. Biol.* 25: 455-463 (1967).
111. SUGIYAMA, T. and NAKADA, D.: Translational control of bacteriophage MS2 RNA cistrons by MS2 coat protein: polyacrylamide gel electrophoresis analysis of proteins synthesized 'in vitro'. *J. molec. Biol.* 31: 431-440 (1968).
112. SUGIYAMA, T., STONE, H.O. and NAKADA, D.: Protein synthesis directed by an amber coat-protein mutant of the RNA phage MS2. *J. molec. Biol.* 42: 92-117 (1969).
113. SVEDBERG, T. and PEDERSON, K.O.: The ultracentrifuge (Clarendon Press, London 1940).
114. TISSIERES, A., WATSON, J.D., SCHLESSINGER, D. and HOLLINGWORTH, B.R.: Ribonucleo-protein particles from *Escherichia coli*. *J. molec. Biol.* 1: 221-233 (1959).
115. VALENTINE, R.C. and STRAND, M.: Complexes of F-pili and RNA bacteriophage. *Science* 148: 511-513 (1965).
116. VESTERBERG, O. and SVENSSON, H.: Isoelectro fractionation analysis and characterization of ampholytes in natural pH gradients. IV.- Further studies on the resolving power in connection with separation of myoglobins. *Acta chem. scand.* 20: 820-834 (1966).
117. VINUELA, E., ALGRANATI, I.D., FEIX, G., GARWES, D., WEISSMANN, C. and OCHOA, S.: Virus-specific proteins in *E. coli* infected with some amber mutants of phage MS2. *Biochim. biophys. Acta* 155: 558-565 (1968).
118. VINUELA, E., ALGRANATI, I.D. and OCHOA, S.: Synthesis of virus-specific proteins in *E. coli* infected with the RNA bacteriophage MS2. *Europ. J. Biochem.* 1: 3-11 (1967).
119. WEBER, K.: Amino acid sequence studies of the tryptic peptides of the coat protein of the bacteriophage R17. *Biochemistry* 6: 3144-3154 (1967).
120. WEBER, K. and KONIGSBERG, W.: Amino acid sequence of the f2 coat protein. *J. biol. Chem.* 242: 3563-3578 (1967).
121. WEBER, K. and KUTER, D.J.: Reversible denaturation of enzymes by sodium dodecylsulfate. *J. biol. Chem.* 246: 4504-4509 (1971).
122. WEBER, K. and OSBORN, M.: The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulphate-polyacrylamide electrophoresis. *J. biol. Chem.* 244: 4406-4412 (1969).
123. WITTMANN-LIEBOLD, B. and WITTMANN, H.G.: Coat proteins of strains of two RNA viruses. *Molec. gen. Genetics* 100: 264-274 (1967).
124. YAMAMOTO, K.R., ALBERTS, B.M., BENZINGER, R., LAWHORN, L. and TREIBER, G.: Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. *Virology* 40: 734-744 (1970).
125. ZIPPER, P. and KRATKY, O.: An X-ray small angle study of the bacteriophages ϕ and R17. *Europ. J. Biochem.* 18: 1-9 (1971).

